



**Master Biologie des Plantes et des Microorganismes, Biotechnologies,  
Bioprocédés.**

**Spécialité : Biologie des Plantes**

**Parcours : M2 Biologie Fonctionnelle des Plantes**

**Année Universitaire 2011-2012**

**Impact du stress hydrique sur l'anatomie et la teneur en  
polyphénols des feuilles de 2 géotypes d'Eucalyptus au champ**



Plateforme d'Imagerie PHIV (AGAP-Cirad)

**Bénédicte Favreau**

Soutenu le 22 juin 2012

## Remerciements

Avant de présenter le travail réalisé dans le cadre de ce stage de Master 2, je tenais à remercier tous ceux qui sont intervenus de près ou de loin dans ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Marc Gion et Emilie Villar qui m'ont proposé ce sujet.

J'adresse mes remerciements particuliers à Jean-Luc Verdeil et Geneviève Conejero pour m'avoir accueilli au sein de Phiv. Un grand merci à Jean-Luc pour ta disponibilité, ta rigueur scientifique, et ta vision salutaire de la recherche. Grâce à toi, j'ai enfin mis un pied dans le monde végétal !

Je voudrais remercier Fabienne Montés qui a acceptée de m'accueillir dans son bureau, qui m'a guidée tout au long des expérimentations et sans laquelle je n'aurais pu faire ce travail. Et merci pour tes bonnes blagues qui m'ont aidé à passer ces longues heures devant mon ordinateur à m'arracher les yeux en comptant des grains d'amidon.

Mes remerciements s'adressent également à Marc Lartaud qui m'a aidé dans la réflexion sur les mesures anatomiques, qui a conçu le module d'analyse d'image grâce auquel j'ai générer toutes ces données, et qui m'a évité un syndrome du canal carpien et quelques 10èmes de vision en moins. Et merci aussi pour les tickets piscine sans laquelle mes muscles seraient aujourd'hui tétanisés!

Merci à Chantal Hamelin pour sa capacité à rendre les statistiques compréhensibles.

Merci à Christine Sanier d'avoir partagée son expérience d'ancienne étudiante GFP, et à Valérie Caruana.

J'adresse aussi mes remerciements à mes collègues intermittents de la recherche, chercheurs en recherche d'équipe, stagiaires, post-doc, CDD... : Merci à Fred pour tes stomates farcis, et surtout n'oublies pas 2013... Merci à Pilar avec qui j'ai partagé quelques cm<sup>2</sup> d'espace vital. Merci à Mayeul et Amélie pour les moments partagés autour du café à refaire le monde.

Merci à Jean-Marc Bouvet, à Roselyne, Marie, Alexandre et Gilles pour m'avoir soutenu pendant ce retour aux études.

<b>1. Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Adaptation des plantes à la sécheresse .....</b>	<b>5</b>
2.1. Réponse physiologique de la plante à la contrainte hydrique .....	6
2.2. Impact du stress hydrique sur l'anatomie foliaire .....	8
2.3. Réponse biochimique à l'adaptation à la sécheresse au niveau foliaire .....	9
2.3.1. Régulation du potentiel hydrique par les osmolites .....	9
2.3.2. Hormones liées à la signalisation de la fonction stomatique .....	10
2.3.3. Molécules impliquées dans la réponse au stress oxydatif.....	10
2.4. Réponse génomique au stress hydrique.....	11
2.5. Réponse épigénétique au stress hydrique.....	12
<b>3. Quelques spécificités de la réponse des arbres à la contrainte hydrique.....</b>	<b>12</b>
<b>4. Contexte de l'étude et objectifs .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Résultats .....</b>	<b>16</b>
5.1. Analyse des caractères anatomiques foliaires.....	16
5.1.1. Influence du génotype sur les caractères anatomiques foliaires .....	17
1.1.1. Influence du traitement hydrique sur les caractères anatomiques foliaires .....	18
1.1.1. Influence de la date de prélèvement sur les caractères anatomiques foliaires.....	19
1.2. Analyse des polyphénols .....	20
1.2.1. Influence de l'interaction génotype-traitement hydrique sur la variation de la teneur en polyphénols totaux.....	20
1.1.1. Influence de l'interaction génotype- traitement hydrique sur la variation de la teneur individuelle des polyphénols .....	20
1.2. Discussion .....	22
<b>2. Matériel et méthodes .....</b>	<b>27</b>
2.1. Plan d'expérimentation.....	27
2.2. Matériel végétal .....	28
2.3. Analyses de l'anatomie foliaire.....	28
2.4. Analyse de la teneur en polyphénols.....	28
2.5. Analyse des données .....	28
<b>3. Références bibliographiques.....</b>	<b>29</b>
<b>4. Annexes.....</b>	<b>32</b>

## **Résumé**

L'Eucalyptus est une espèce forestière tropicale principalement cultivée en plantations industrielles. Une des principales raisons de sa large utilisation est sa croissance rapide et sa facilité de mise en culture. Son bois est majoritairement utilisé dans l'industrie de la pâte à papier ou pour le charbon. En raison d'une demande en bois en constante augmentation, un accroissement des surfaces de plantation est nécessaire ainsi que l'amélioration des rendements. Mais de nombreux problèmes doivent être résolus. Les plantations sont localisées dans des pays tropicaux où les conditions environnementales ne sont pas très favorables, en particulier concernant l'apport en eau. Or le taux de croissance de l'Eucalyptus varie fortement en fonction de la contrainte hydrique. Des hybrides ou des variétés plus efficaces en termes d'utilisation de l'eau doivent donc être développés. Peu d'études ont été menées sur la réponse des arbres au stress hydrique, en condition naturelle. Dans ce contexte, une expérimentation au champ a été mise en place au Congo afin d'étudier le comportement de 2 géotypes contrastés d'Eucalyptus soumis à 2 traitements hydriques en saison sèche : non-irrigué (correspondant aux conditions en plantation), irrigué (levée de la contrainte par irrigation). Pour ces 2 géotypes, nous avons estimé l'impact du stress hydrique, à la fin de deux saisons sèches successives par la mesure de différents caractères anatomiques des feuilles ainsi que de leur teneur en polyphénols. Une analyse de variance a permis d'évaluer l'influence du géotype, du traitement hydrique et de la date de prélèvement sur la variation de ces caractères. Nous avons identifié quels étaient les caractères sous l'influence forte d'un effet géotype, géotype-environnement. L'influence potentielle des caractères liés au géotype et des caractères modulés par l'environnement sur la résistance des deux géotypes à la saison sèche sera discutée.

The Eucalyptus is a tropical forest species cultivated in industrial field. It is largely used because it's an easily cultivated fast growing species. Its wood is mainly used in paper industry and for charcoal. Because of the rising demand in commercial timber, the surface of plantations has to be increased as well as the yield improved. But numerous problems have to be fixed. The plantations are located in tropical countries where environmental conditions are not favourable, in particular regarding the water supply. Moreover, the growth yield varies strongly with water stress. For this reason, more efficient hybrids or varieties have to be improved. Only few studies were conducted on tree responses to water stress, in natural conditions. In this context, an experiment on field was set up in Congo to study the contrasted behavior of 2 Eucalyptus genotypes submitted to 2 water treatment during the dry season : non irrigated (normal field condition) and irrigated (removal of the constraint by irrigation). Our objective was to estimate the water stress impact on these 2 genotypes at the end of 2 drying season, by studying various anatomical characters in leaves as well as polyphenol content. An analysis of variance was performed to measure the effect of the genotype, water treatment and sampling date on the character variation. We have identified which characters were highly influenced by a genotype-environment effect. The potential influence of the characters linked to the genotypes and the ones modulated by the environment on the 2 genotypes resistance, will be discussed.

## **1. Introduction**

L'Eucalyptus est une angiosperme appartenant à la famille des *Myrtaceae*. C'est un arbre tropical à croissance rapide, comprenant environ 625 espèces et sous-espèces. Elles sont majoritairement natives d'Australie, avec quelques espèces provenant de Nouvelle-Guinée et d'Indonésie. Seules quelques espèces ont un potentiel qui permet de les cultiver en plantations industrielles et 5 espèces représentent actuellement 50% de la production (Shunder, 1991). En 2008, la surface totale d'Eucalyptus plantée était de 20 millions d'hectares en Amérique du Sud, Asie et Afrique, principalement en Inde (22%), au Brésil (20%) et en Chine (14%) (Git Forestry Consulting, 2008) (Voir annexe 1). L'Eucalyptus est principalement planté en monoculture. Son bois est utilisé dans différents secteurs industriels, pour la production de pâte à papier, et de charbon pour la fabrication de l'acier, mais également pour des usages domestiques (bois énergie ou bois de construction), en particulier dans les pays en voie de développement. Une des principales raisons de sa large utilisation est sa croissance rapide et sa facilité de mise en culture : facilité d'obtention des graines, bon taux de germination, adaptabilité à croître dans différents types de sols et de conditions climatiques. Mais son taux de croissance varie fortement en fonction de l'environnement, de la fertilité du sol et de l'apport d'eau en particulier (Merchant et al., 2007).

L'augmentation constante de la demande en bois conduit à une extension des plantations. En, 2005, la production de bois était de 2.5 milliards de m<sup>3</sup> (bois rond et combustible ligneux), et la demande en bois devrait progresser de 50% en 2020 (FAO, 2008). Pour répondre à cette demande, une augmentation des surfaces de plantation et une amélioration des rendements est nécessaire, mais de nombreux problèmes doivent être résolus. Les évaluations des tendances du changement climatique prédisent une altération de la fréquence et de l'intensité des pluies avec des périodes sèches plus longues (IPCC, 2007). Les plantes vont être soumises à des stress de plus en plus importants avec une augmentation de la sensibilité aux maladies et pathogènes. Dans ce nouveau contexte environnemental, il faut développer des variétés capables de s'adapter à ces conditions moins favorables tout en maintenant leur croissance. Pour cela, des hybrides ou des variétés plus efficaces en termes d'utilisation de l'eau doivent être développés.

## **2. Adaptation des plantes à la sécheresse**

Le stress abiotique est défini comme une réponse de la plante à des changements environnementaux (lumière, eau, carbone, minéraux) induisant une réduction du

développement et de la croissance (Boyko and Kovalchuk, 2011). Il y a différents niveaux moléculaires de réponses (ADN, chromatine, transcrits, protéines) à différentes échelles de la plante (de la cellule à la plante entière). Les réponses des plantes à ces stress sont soit plastiques et réversibles, soit irréversibles (Cramer et al., 2011; Skirycz and Inze, 2010). Pour s'adapter au stress hydrique, les plantes peuvent utiliser 3 stratégies: l'échappement, l'évitement ou la tolérance (Chaves et al., 2003; Levitt, 1972; Turner et al., 1986) (voir annexe 2):

- L'échappement nécessite un haut degré de plasticité. La plante est capable de terminer son cycle de vie avant que les effets du déficit hydrique ne se produisent. Cette stratégie est utilisée en zones arides où les plantes natives sont capables d'utiliser au maximum les ressources du sol afin d'avoir des taux de croissance importants tant que l'humidité du sol est maintenue, et un cycle de vie court.
- L'évitement à la sécheresse permet de limiter les pertes en eau et d'optimiser l'utilisation de la ressource en eau disponible. Elle permet d'éviter une perte d'homéostasie. Les plantes utilisent une variété de traits adaptatifs afin d'empêcher la déshydratation tissulaire, soit en maintenant un potentiel hydrique élevé, soit en tolérant un potentiel bas.
- La tolérance se réfère à la capacité de la plante à maintenir ses grandes fonctions physiologiques (nutrition, photosynthèse, reproduction...) pendant des périodes où le potentiel hydrique dans les tissus est bas.

Ces stratégies ne sont pas exclusives, et en pratique les plantes peuvent combiner différents types de réponse. Ces différents niveaux vont être détaillés dans les chapitres ci-dessous.

### **2.1. Réponse physiologique de la plante à la contrainte hydrique**

**Lors d'un déficit hydrique**, la plante essaie de réguler son niveau d'alimentation en eau et de maintenir son volume cellulaire constant afin de poursuivre sa croissance.

- Le niveau d'eau peut être contrôlé par la restriction des sorties d'eau. Quand la teneur en eau du sol est réduite, les racines envoient des signaux chimiques à la tige puis à la feuille. En réponse, les stomates se ferment pour empêcher l'évaporation. C'est un des premiers événements de réponse à la sécheresse. La réponse stomatique entraîne une modification d'autres facteurs tels que la diminution de l'absorption du CO<sub>2</sub> et donc de la photosynthèse. L'assimilation en carbone diminue alors en faveur de la photorespiration, avec fixation d'O<sub>2</sub> à la place de CO<sub>2</sub>. Ce processus biochimique de conversion coûte de l'énergie à la plante et résulte en une perte nette en CO<sub>2</sub>. Il y a également un autre mécanisme d'arrêt de la

photosynthèse non lié aux stomates mais à l'appareil photosynthétique. Lorsque celui-ci est endommagé suite à un stress photo-oxydant avec production de radicaux libres, il n'est plus capable d'assimiler le CO<sub>2</sub> piégé dans la chambre stomatique et il y a réduction de la photosynthèse (Anjum et al., 2011; Flexas and Medrano, 2002).

La fermeture des stomates sert également comme régulateur de pression permettant d'éviter une diminution de la conductance hydraulique conduisant au phénomène de cavitation chez les arbres. La cavitation est l'envahissement brutal des éléments conducteurs par une phase gazeuse, sous forme de bulles de vapeur d'eau et d'air, et provoquent l'embolie des vaisseaux. Elle peut entraîner de graves conséquences physiologiques allant jusqu'à la mort de certaines parties ou même de l'arbre entier (Buckley, 2005).

➤ Le niveau d'eau peut également être régulé par le maintien des entrées d'eau, grâce à l'ajustement osmotique, qui se traduit par une augmentation de la concentration en solutés et une diminution du potentiel hydrique. Le mouvement de l'eau des racines vers les feuilles est ainsi maintenu, ce qui induit la turgescence des cellules de gardes, l'ouverture des stomates et la photosynthèse.

**Suite à un déficit hydrique** et à une période d'inhibition de la croissance, celle-ci peut être réactivée mais de façon modérée. Les plantes qui vivent en conditions de stress ont généralement une faible croissance. Une des adaptations des plantes à des conditions de déficit hydrique est l'élimination des organes à courte durée de vie au profit de ceux à longue vie pour réduire le coût de construction de nouveaux organes (Casper et al., 2001). Cela peut se traduire par une modification de la durée de vie des feuilles, de leur nombre et de leur surface spécifique. Le faible taux de renouvellement des feuilles permet d'améliorer l'efficacité de l'utilisation des nutriments en évitant une demande supplémentaire en carbone, et en eau, en cas de synthèse de nouvelles feuilles (Casper et al., 2001).

Les feuilles matures sont éliminées après sénescence, qui est un des symptômes du stress oxydatif. C'est une forme de mort cellulaire programmée qui se déroule de manière ordonnée. Les chloroplastes sont les premiers organites à se dégrader (perte de la membrane chloroplastique, distorsion des chloroplastes) avec dégradation de la chlorophylle, tandis que le noyau restera intact jusqu'aux dernières étapes de la sénescence. Durant cette sénescence, il se produit une réallocation des ressources (azote, phosphore, métaux) dans les tiges ou les jeunes feuilles en croissance, ainsi qu'un ralentissement général de la croissance (Quirino et al., 2000).

L'effet du déficit hydrique sur les jeunes feuilles est opposé à celui des feuilles matures. Les feuilles qui survivent et croissent ont une taille plus réduite que des feuilles du même âge provenant de plants irrigués. Les feuilles en croissance, mais de taille réduite, régulent la transpiration par augmentation du nombre de stomates mais également une réduction de leur taille (Hsiao, 2000).

**La capacité des plantes à s'acclimater au déficit hydrique** est donc associée à leur aptitude à s'adapter à la diminution de la photosynthèse qui entraîne des perturbations dans de multiples processus biochimiques et physiologiques (taux de transpiration, conductance stomatique, efficacité d'utilisation de l'eau, absorption de CO<sub>2</sub>) et un impact négatif sur la croissance (Anjum, 2011).

## **2.2. Impact du stress hydrique sur l'anatomie foliaire**

Par sa fonction stomatique, la feuille est un organe essentiel car elle a un rôle majeur dans la régulation des besoins en eau (transpiration), dans la synthèse de matières organiques (photosynthèse) contribuant à la nutrition et donc à la croissance de la plante. La réponse de la plante aux conditions environnementales et plus particulièrement au déficit hydrique, qui est le stress le plus limitant de la croissance, a un impact sur la structure foliaire. Il diffère selon la nature et la durée du stress (Anjum et al., 2011).

Les feuilles peuvent être plus épaisses en raison d'une augmentation de l'épaisseur du mésophylle et des cuticules, avec augmentation de la teneur en matière sèche par surface et unité de volume (Bosabalidis and Kofidis, 2002). Un stress modéré (50% crop evapotranspiration) induit une diminution de l'épaisseur de l'épiderme supérieur et inférieur tandis qu'un stress sévère (0% Etc) a un impact négatif sur l'épaisseur du mésophylle et du parenchyme palissadique.

Il peut y avoir une augmentation du nombre de cellules dans les épidermes inférieur et supérieur, dans le parenchyme palissadique et lacuneux. En revanche, la taille des cellules diminue. L'augmentation du nombre de cellules dans le mésophylle est une stratégie pour réduire la perte en eau, par diminution de l'espace intercellulaire et donc limitation du mouvement de l'eau (Bosabalidis and Kofidis, 2002). L'augmentation du nombre de chloroplastes permet de maintenir la photosynthèse malgré la diminution de l'ouverture stomatique (Bosabalidis and Kofidis, 2002). Sur le long terme, une dégénérescence des chloroplastes peut être observée (Bussoti, 1994). La densité et la taille des stomates augmente avec le niveau de stress (Laajimi, 2011) ou de l'ouverture stomatique (Bosabalidis and



Kofidis, 2002). Un nombre élevé de stomates permet une transpiration plus importante (Bosabalidis and Kofidis, 2002), mais la perte serait réduite par l'augmentation de l'épaisseur des épidermes. De plus, des inclusions peuvent se former composées d'huiles, de tanins ou phénols (Bacelar et al., 2006); (Bussotti et al., 1995);(Chartzoulakis et al., 2002); (Laajimi et al., 2011).

### **2.3. Réponse biochimique à l'adaptation à la sécheresse au niveau foliaire**

#### **2.3.1. Régulation du potentiel hydrique par les osmolites**

La diminution du potentiel hydrique du sol en conditions de sécheresse provoque une perte importante de la turgescence au niveau de la plante. Pour maintenir la turgescence, la plante met en place un mécanisme d'ajustement osmotique liée à sa capacité à accumuler certains solutés. Une perte trop importante de la turgescence entraîne une déstructuration des membranes et systèmes enzymatiques (Mahajan and Tuteja, 2005). Une accumulation de différents osmorégulateurs permet la diminution du potentiel osmotique (Chaves et al., 2003):

- Les ions inorganiques, tels que le potassium contribue à 40% environ de l'osmolarité (Gaudillere and Barcelo, 1990).
- Les cyclitols et les polyols, en particulier le mannitol et le sorbitol ont un rôle majeur dans l'ajustement osmotique. Leur concentration augmente chez des plantes en déficit hydrique (Lo Bianco et al., 2000).
- La teneur en acides aminés libres augmente significativement en situation de déficit hydrique, en particulier la proline, l'acide aspartique et l'acide glutamique. Parmi ces acides aminés, la proline joue un rôle particulièrement important. L'accumulation de proline est la 1<sup>ère</sup> réponse des plantes exposées à un déficit hydrique, et est corrélée avec la tolérance au stress. Elle a également un rôle dans la préservation de la structure des protéines, la réduction de la peroxydation des lipides et le maintien de l'intégrité des membranes (Verslues and Sharma, 2010).
- Les amines quaternaires, tels que la glycine bétaine ou l'alanine bétaine, s'accumulent lors de différents types de stress chez certaines espèces. Ces molécules ont aussi un rôle dans la stabilisation de la conformation des protéines (Ramachandra et al., 2004).

### **2.3.2. Hormones liées à la signalisation de la fonction stomatique**

La fonction stomatique est modulée par des signaux chimiques transmis par les racines quand la teneur en eau du sol est réduite. Les molécules impliquées dans la signalisation sont principalement l'acide abscissique (ABA), les cytokinines et l'éthylène.

ABA est une hormone synthétisée dans les racines et les feuilles, impliquée dans la croissance, mais également dans la régulation du fonctionnement des stomates. La déshydratation conduit à une augmentation de sa concentration. Il se produit un efflux de  $K^+$  des cellules de gardes, entraînant une perte de la turgescence conduisant à la fermeture des stomates (Kim et al., 2010).

Les cytokinines sont des promoteurs de la division cellulaire, et sont principalement synthétisés dans les racines puis transportés vers les tiges. Elles antagonisent plusieurs processus physiologiques contrôlés par ABA. Des concentrations élevées en cytokinines peuvent interférer sur l'action d'ABA sur les stomates. Lors d'un déficit hydrique, la concentration en cytokinines dans les feuilles diminue ce qui conduit à une sénescence accélérée (Pospisilova et al., 2000).

L'éthylène est une phytohormone gazeuse. Tous les tissus végétaux produisent de l'éthylène mais sa biosynthèse augmente lors d'étapes critiques du développement (maturation des fruits, sénescence, germination) mais également en réponse à des variations de l'environnement (sécheresse, chocs thermiques, blessures). Dans le cas de stress abiotiques, l'éthylène est associé à un retard de croissance et à la formation des cheveux racinaires (Potters et al., 2009).

### **2.3.3. Molécules impliquées dans la réponse au stress oxydatif**

La production de Reactive Oxygen Species (ROS) dans le chloroplaste fait partie des premières réponses biochimiques des cellules en réponse à un stress hydrique. Dans ce contexte, la photosynthèse est réduite, la plante ne peut plus utiliser l'excès d'énergie apportée par la lumière et un stress oxydatif va se produire. Il y a production de ROS, sous-produits du métabolisme de l'oxygène (ions oxygène  $O_2^-$ , radicaux libres  $\cdot OH$ , peroxydes  $H_2O_2$ ), ce qui va déclencher un processus visant à éliminer les espèces actives d'oxygène (Chaves et al., 2003). Lors d'un stress modéré, ils jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire. Mais en cas de stress sévère, la concentration en ROS augmente causant un dommage oxydatif pouvant conduire à la dégradation des protéines, la fragmentation de l'ADN, la peroxydation des lipides et la mort cellulaire (Chaves et al., 2003).

En réponse aux attaques des ROS, la plante a un système protecteur interne qui va capter les radicaux libres. Il est composé d'antioxydants enzymatiques (Superoxyde Dismutase SOD, Peroxydase POD, Catalase CAT) et non-enzymatiques (glutathion, ascorbate, caroténoïdes). La capacité de ce système à combattre les radicaux libres peut être corrélée à la résistance de la plante à lutter contre le déficit hydrique (Cruz de Carvalho, 2008).

Parmi les molécules antioxydantes produites par les plantes, il y a les composés phénoliques. Les feuilles d'eucalyptus renferment des glandes à huiles, et la production abondante de cette huile, composés de polyphénols est une des caractéristiques principales de cette famille.

Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de composés phénoliques sont induits par le stress (Winkel-Shirley, 2002). Mais il n'est pas encore clairement démontré que les propriétés antioxydantes de ces métabolites secondaires sont impliquées dans les mécanismes de résistance au stress. En revanche ce sont des marqueurs intéressants du stress chez plusieurs espèces puisque leur concentration augmente en été, quand les plantes sont sujettes à des températures élevées ou à la sécheresse (Hernandez et al., 2009).

#### **2.4. Réponse génomique au stress hydrique**

En réponse à un stress, qu'il soit biotique ou abiotique, de nombreux gènes sont soit surexprimés ou sous-exprimés. Diverses études chez *Arabidopsis* et *Oryza sativa* ont montrées qu'il y avait des voies de signalisation et de régulation communes à ces 2 espèces pour différents types de stress, avec certaines voies plus spécifiques d'un type de stress.

Les produits des gènes impliqués dans la résistance au stress peuvent être classés en 2 groupes, les protéines fonctionnelles qui interviennent dans des processus biochimiques) et les protéines de régulation qui vont intervenir dans le contrôle de la différenciation, prolifération et survie cellulaire (Shinozaki et al., 2003) (voir annexe 3). Les gènes codant pour des protéines fonctionnelles sont impliqués dans la résistance au stress abiotiques en général. Le second groupe contient les gènes codant pour les protéines impliqués dans la transduction du signal et les gènes de réponse au stress.

Parmi les gènes impliqués dans les voies de régulation (voir annexe 4), certains sont dits ABA-dépendant, car sur-régulés quand le niveau d'ABA augmente en réponse à un stress. L'expression de ces gènes est activée *via* les éléments « ABA-responsive » dans les régions promotrices. Certains de ces gènes sont spécifiques de la résistance à la sécheresse tels que les facteurs de transcription ABRE (ABA-responsive element)/ABF (ABRE binding factor). Les autres, tels que NAC, MYB2 et MYC2 sont également impliqués dans la résistance au stress

biotiques et mécaniques. D'autres gènes inductibles par un stress hydrique ne répondent pas à un traitement par l'ABA et sont dit ABA-indépendant. Les facteurs de transcription DREB2, DREB1/CBF (Dehydration Response Element Binding protein/C-repeat Binding Factor) sont activés par la réponse au froid et à la sécheresse, tandis que NAC est activé en réponse à la sécheresse (Agarwal and Jha, 2010; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

### **2.5. Réponse épigénétique au stress hydrique**

Les plantes doivent continuellement ajuster leur réponse à des stimuli externes pour pouvoir s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. Les réponses peuvent être soit génétiques, héréditaires et irréversibles (génétique), soit réversibles héréditaires ou pas, et n'induisant pas de modifications dans la séquence nucléotidique de l'ADN (épigénétique) (Boyko and Kovalchuk, 2011). Ils conduisent également à des modifications de la conformation de la chromatine, du profil de méthylation, induisent la biosynthèse des petits ARNs (Mirouze and Paszkowski, 2011), ou activent des éléments transposables (Molinier et al., 2006). Par exemple, une hyperméthylation de l'ADN a été rapportée chez le pois dans des conditions de déficit hydrique (Labra et al., 2002). Chez *Populus*, 197 miRNA sur ou sous-régulés ont été identifiés dans des feuilles (Li et al., 2011). Ils sont potentiellement impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes impliqués dans le stress hydrique. Des modifications post-translationnelles ont également été rapportées comme l'ubiquitination et la SUMOylation (Neumann, 2011). Les modifications épigénétiques ont un impact sur l'expression des gènes, et permettent à la plante et à ses descendants d'ajuster leur métabolisme de façon plus rapide et flexible que par des modifications génétiques. Ces mécanismes ont donc un rôle important dans la plasticité phénotypique en réponse à un stress (Boyko and Kovalchuk, 2011).

### **3. Quelques spécificités de la réponse des arbres à la contrainte hydrique**

Les arbres ont des caractéristiques biologiques et physiologiques qui imposent certaines contraintes pour leur exploitation et implique des différences dans les méthodes des programmes d'amélioration pour la résistance aux stress.

✓ Ce sont des plantes à longue vie, avec des cycles d'exploitation de longue durée. Par exemple, l'âge d'exploitation des résineux dans les plantations en Europe est de l'ordre de 50 ans. Il est donc difficile d'adapter l'environnement à la plante, avec l'agronomie ou les produits phytosanitaires, comme pour les cultures annuelles. Le processus d'amélioration

nécessite une action à long terme et il est donc plus coûteux. On compte généralement 20 à 30 ans de travail pour créer un nouveau génotype. Cette lenteur peut être compensée par un travail de front, en utilisant toutes les approches disponibles et possibles (Nanson, 2004).

✓ Ce sont des plantes de grande taille à fort encombrement. Cela peut se traduire par un accès plus difficile aux organes floraux pour la réalisation de croisements contrôlés, de difficultés de récoltes des graines.

✓ De plus, le stade juvénile d'un arbre peut durer plusieurs années, sans reproduction possible, et sa croissance est continue, mais ralentie en saison sèche. Les cycles de croissance des arbres imposent des contraintes dans les programmes d'amélioration, comme pour l'identification des génotypes intéressants ou la difficulté de l'estimation de la mesure de l'héritabilité d'un caractère, variable avec l'âge.

Les espèces forestières utilisées en plantation, se distinguent des plantes cultivées annuelles ou bisannuelles à de nombreux égards. Comparativement, elles ont subies peu d'événements de domestication et d'amélioration. Elles ont donc généralement une très large base génétique et des mécanismes efficaces d'adaptation aux conditions environnementales (Nanson, 2004). Les espèces à longue durée de vie ont une probabilité plus forte de connaître des stress (biotiques ou abiotiques). Pourtant l'altération du climat et particulièrement du régime des précipitations influence fortement la survie des arbres. La modification de l'intensité des phénomènes climatiques est telle que les capacités de résistance peuvent être dépassées. Par exemple, les forêts tempérées ont déjà subi des baisses majeures de croissance et des niveaux élevés de mortalité des arbres comme lors des épisodes de sécheresse au Canada en 2001-2002 ou de canicule, en Europe en 2003. Dans des zones semi-arides (1/3 environ des terres émergées du globe) ou arides, ces effets sont encore plus marqués et vont s'accroître si l'hypothèse, pour les décennies à venir, de variations climatiques plus marquées est validée. Quand aux forêts tropicales humides, elles sont aussi affectées par ces phénomènes liés à El Nino (Allen, 2009). Les mécanismes d'adaptation des plantes sont donc cruciaux pour permettre à la plante de percevoir leur environnement et ainsi d'ajuster leur morphologie et physiologie aux conditions locales. L'acclimatation des plantes aux stress est très documentée mais les modèles d'études sont principalement basés sur les plantes annuelles (Osakabe et al., 2011). De plus, la plupart des études chez les arbres ont été conduites en serre, mais peu l'ont été en conditions réelles en raison des contraintes liées au contrôle des variables, mais également en raison de caractéristiques physiologiques citées ci-dessus.

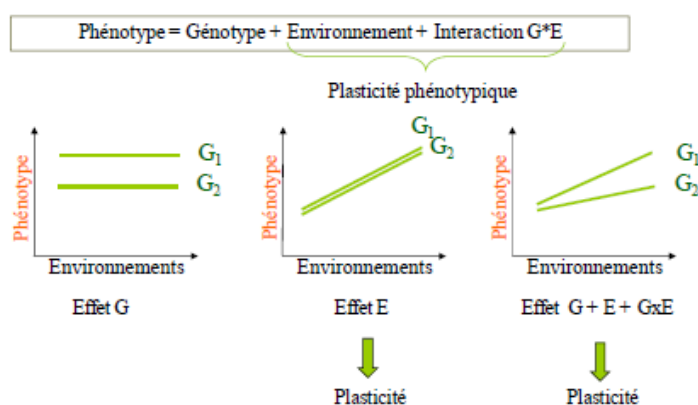
La résistance à la sécheresse est variable entre les espèces mais également intra-espèces. Des études génétiques en serre ont permis de mettre en évidence la variabilité intra et

interspécifique ainsi que la relation entre le génotype et l'environnement dans la tolérance aux stress. Mais les mécanismes impliqués dans la tolérance et la résistance des arbres forestiers sont encore mal connus (Hamanishi et al., 2010).

Les arbres en raison de la présence d'une phase juvénile très longue peuvent être soumis à plusieurs stress abiotiques avant de pouvoir se reproduire par voie sexuée. En raison de cette contrainte biologique majeure, ils vont privilégier les 2 derniers mécanismes ont un impact majoritaire sur l'acquisition d'une tolérance aux stress. L'adaptation génétique est la résultante de la sélection naturelle qui permet d'obtenir des génotypes adaptés aux conditions environnementales. La plasticité phénotypique qui se définit comme étant la capacité d'un génotype à produire plusieurs phénotypes dans un environnement changeant est une stratégie particulièrement adaptée à l'état pérenne des arbres. Cette réponse est plus rapide, et est donc particulièrement adaptée aux organismes à cycles longs tels que les arbres.

Pour résister aux modifications de son environnement et au risque d'extinction, une population peut d'une manière générale utiliser 3 mécanismes : la dispersion pour rechercher un nouvel environnement plus favorable, l'adaptation génétique et la plasticité phénotypique (Chevin et al., 2010). Les arbres en raison de la présence d'une phase juvénile très longue peuvent être soumis à plusieurs stress abiotiques avant de pouvoir se reproduire par voie sexuée. En raison de cette contrainte biologique majeure, ils vont privilégier les 2 derniers mécanismes, qui auront ont un impact majoritaire sur l'acquisition d'une tolérance aux stress. L'adaptation génétique est la résultante de la sélection naturelle qui permet d'obtenir des génotypes adaptés aux conditions environnementales. La plasticité phénotypique qui se définit comme étant la capacité d'un génotype à produire plusieurs phénotypes dans un environnement changeant est une stratégie particulièrement adaptée à l'état pérenne des arbres. Cette réponse est plus rapide, et particulièrement adaptée aux organismes à cycles longs tels que les arbres.

La plasticité phénotypique peut être décrite à l'aide de courbes de réaction (figure 1). Ces courbes représentent la variation phénotypique de 2 génotypes en fonction d'une gamme d'environnement selon l'effet G (génotype), E (environnement), G+E + GXE (interaction Génotype-Environnement). La comparaison de la plasticité phénotypique entre espèces ou populations fera intervenir préférentiellement les composantes d'une analyse de variance à 2 facteurs (G et E), et l'interaction GxE. La variation phénotypique peut être déterminée par la mesure de différents caractères anatomiques, biochimiques, génétiques...



Ces mesures, dans des conditions environnementales données, permettront d'identifier quels sont les caractères qui sont sous l'influence forte d'un effet génotype-environnement et, de comparer la plasticité phénotypique de 2 génotypes.

**Figure 1** : Courbes de réaction phénotypique de deux génotypes à un environnement (Pigliucci et al., 1996)

#### 4. Contexte de l'étude et objectifs

A partir des années 50, des plantations industrielles d'Eucalyptus ont été mises en place au Congo par le Centre Technique Forestier Tropical (CTFC). Ces arbres sont destinés à l'exportation sous forme de copeaux de bois pour la fabrication de pâte à papier. Différentes espèces ont été introduites qui ont permis de sélectionner certains génotypes selon des critères de production. Puis des hybrides interspécifiques ont été développés, adaptés aux conditions environnementales locales. Mais les contraintes environnementales locales réduisent la productivité des plantations (Villar et al., 2011). Dans les régions où sont localisées les plantations (le long de la côte atlantique du Congo jusqu'à 30 km à l'intérieur des terres), peu de paramètres météorologiques varient au cours de l'année mise à part la pluviométrie. Lors de la saison humide, de fortes pluies se produisent (souvent entre 50 et 100 mm lors d'épisode pluvieux), tandis que la saison sèche est exceptionnellement longue (mai à septembre). Cette saison sèche est très marquée avec un arrêt des précipitations et une diminution des radiations solaires en raison de la présence d'un couvert nuageux (Villar et al., 2011). Pendant cette période, il y a une diminution de l'accroissement des arbres.

Ces conditions sont favorables pour étudier l'impact du stress hydrique chez l'Eucalyptus en conditions naturelles. Dans ce contexte, une expérimentation au champ a été mise en place au Congo, pendant 18 mois, afin d'étudier le comportement de 2 génotypes contrastés d'Eucalyptus soumis à 2 régimes hydriques : une condition irriguée avec apport d'eau pendant la saison sèche et une condition non irriguée sans apport d'eau (voir figure x dans Matériel et Méthodes).

Les 2 génotypes sélectionnés proviennent des 2 programmes d'amélioration successifs au Congo et ont été choisis pour leurs paramètres physiologiques et leur croissance très

contrastés (voir annexe 5). La mesure de la croissance des 2 génotypes montre que le génotype 18-50 a une croissance plus importante que le génotype 1-41. Cette différence est liée à une meilleure croissance lorsqu'il n'y a pas de contrainte hydrique (saison des pluies ou irrigation) et à une inhibition plus ou moins marquée de la croissance en situation de stress (saison sèche). Le génotype 18-50 qui a une meilleure croissance que le génotype 1-41 sera appelé « génotype résistant » par rapport au génotype 1-41 considéré comme « sensible ».

Des études d'écophysiologie et de génomique menées pendant l'expérimentation sont en cours d'analyse afin d'identifier les caractères physiologiques et les bases moléculaires de la croissance supérieure du génotype 18-50 en situation de contrainte hydrique.

Mon sujet quant à lui porte sur l'analyse comparative de l'impact de la sécheresse sur la structure des feuilles des 2 génotypes et sur leur contenu en polyphénols. Dans cet objectif, nous avons mesuré différents caractères anatomiques à partir de coupes histologiques transversales de feuilles, et quantifié les polyphénols foliaires par HPLC. Les échantillons ont été analysés à la fin de la saison sèche de la première année de végétation (8 mois d'âge) ainsi qu'à la fin de la saison sèche de la deuxième année de végétation (20 mois d'âge), pour les 2 traitements hydriques (condition irriguée et non irriguée). Au travers d'une étude comparative entre les deux génotypes, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes:

- Quelles sont les différences dans l'anatomie et la teneur en polyphénols spécifiques de chaque génotype?
- Quel est l'impact respectif du déficit hydrique sur la structure des feuilles des 2 génotypes et sur leur teneur en polyphénols?

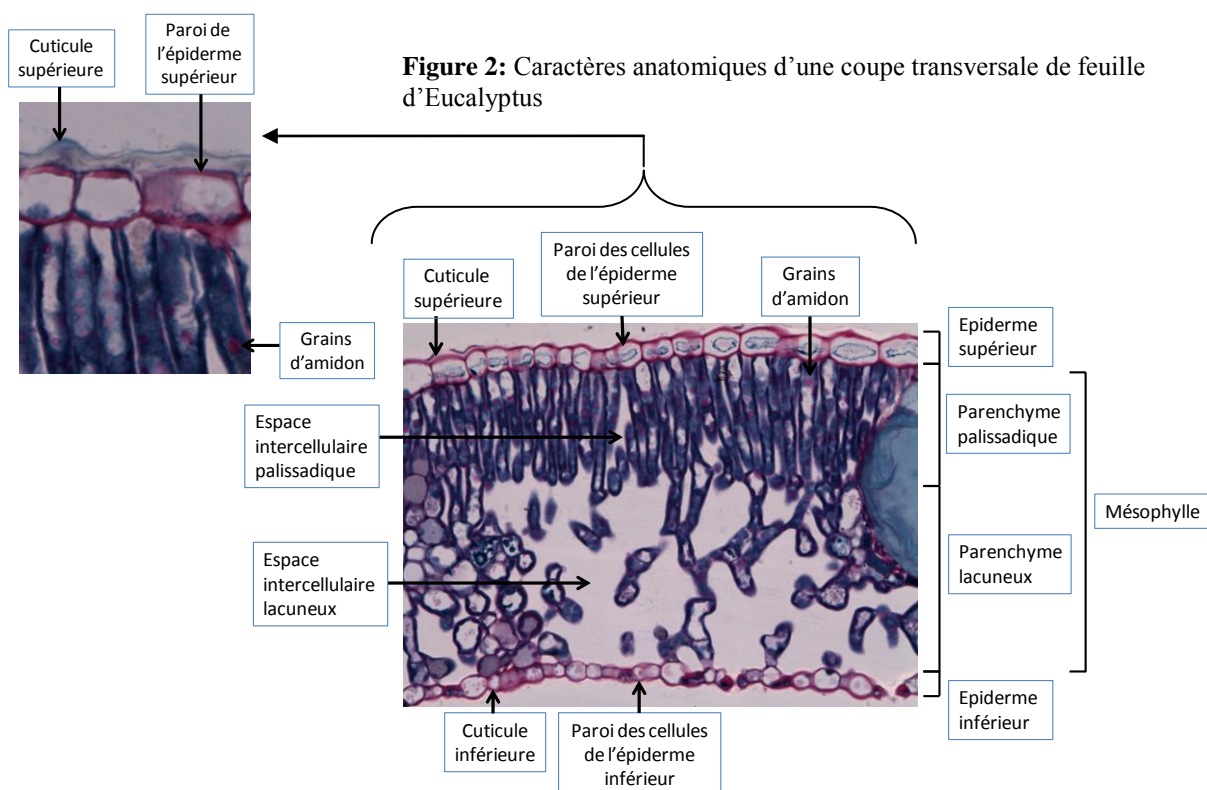
Nous discuterons quelle pourrait être la valeur adaptative des différences observées et en quoi elles peuvent favoriser l'adaptation du génotype résistant à la sécheresse.

## **5. Résultats**

### **5.1. Analyse des caractères anatomiques foliaires**

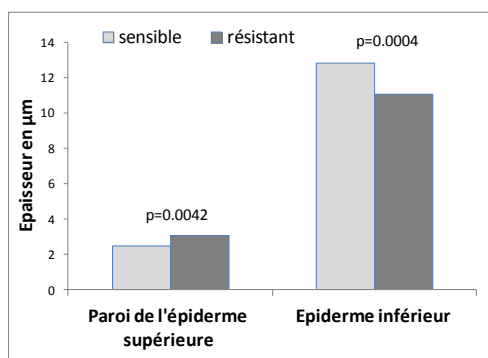
L'anatomie foliaire des 2 génotypes est décrite à l'aide de différents caractères mesurés sur les coupes de feuille (figure 2 et annexe 11). Les résultats de l'ANOVA et de la comparaison de moyennes sont présentés en Annexe 6a et 6b. Les caractères anatomiques varient principalement en fonction du génotype, du traitement hydrique et de la date de prélèvement. Il n'y a aucune interaction hautement significative entre ces différents facteurs.



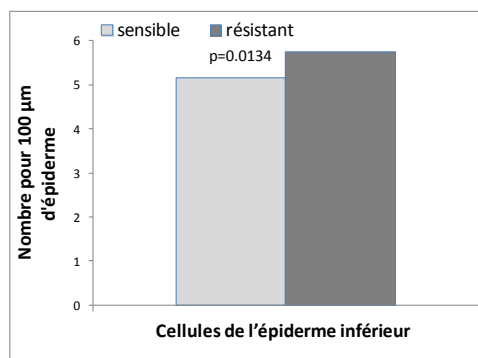


### 5.1.1. Influence du génotype sur les caractères anatomiques foliaires

Sur les 17 caractères mesurés, 10 varient significativement entre les 2 génotypes. La paroi des cellules de l'épiderme supérieur du génotype « résistant » est plus épaisse (+24%) que celle du génotype « sensible » (voir figure 3). L'épiderme inférieure du génotype « résistant » est moins épais (-14%) (Figure 3) et contient un plus grand nombre de cellules (+11%) (figure 4).



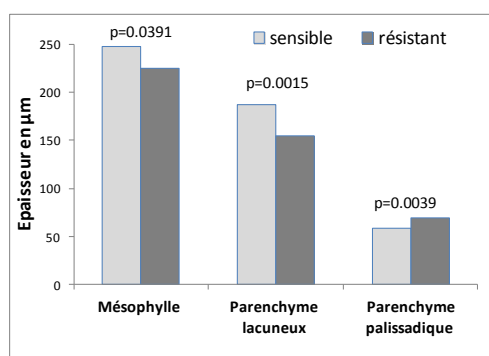
**Figure 3:** Influence du génotype sur l'épaisseur de la paroi des cellules de l'épiderme supérieur et sur l'épaisseur de l'épiderme inférieur



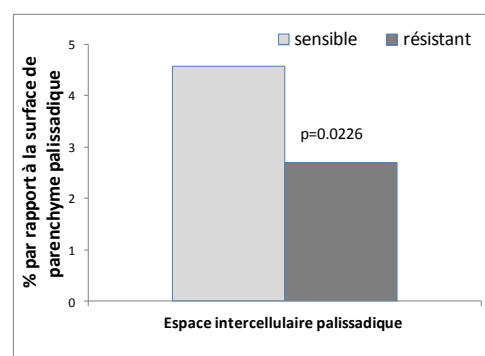
**Figure 4:** Influence du génotype sur le nombre de cellules de l'épiderme inférieur

Le mésophylle et le parenchyme lacuneux (voir figure 5) du génotype « résistant » sont moins épais que ceux du génotype « sensible » (-9% et -17% respectivement). En revanche, le

parenchyme palissadique (figure 5) est plus épais chez le génotype « résistant » que chez le génotype « sensible » (+18%), avec une surface d'espace intercellulaire réduite (-41%) (figure 6).

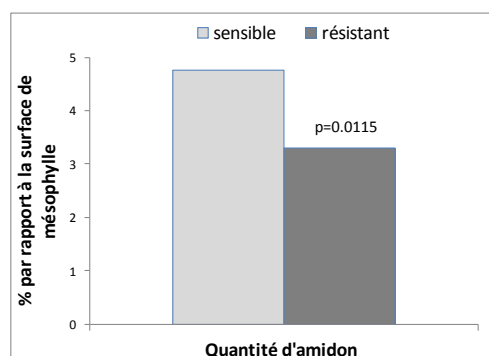


**Figure 5:** Influence du génotype sur l'épaisseur du mésophylle, des parenchymes lacuneux et palissadique

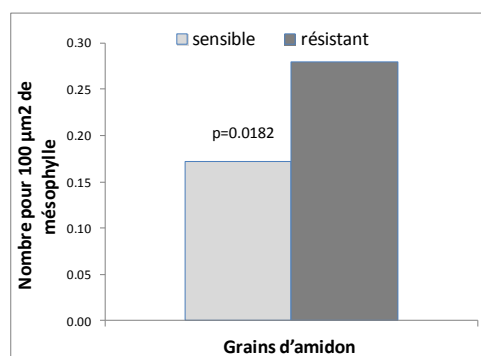


**Figure 6:** Influence du génotype sur l'espace intercellulaire au sein du parenchyme palissadique

Les feuilles du génotype « résistant » contiennent moins d'amidon que le « sensible », que la quantité soit estimée en % de surface par rapport au mésophylle (-31%) (figure 7) ou en nombre de grains (-38%) (figure 8).



**Figure 7:** Influence du génotype sur la la surface d'amidon



**Figure 8:** Influence du génotype sur la quantité de grains d'amidon

### 1.1.1. Influence du traitement hydrique sur les caractères anatomiques foliaires

Seulement 5 caractères anatomiques varient significativement en fonction du traitement hydrique, quel que soit le génotype et la date de prélèvement. Le nombre de cellules par unité de longueur des épidermes (supérieur et inférieur) (figure 9) est plus élevé en condition non irriguée qu'en condition irriguée (+10%), et la paroi des cellules de l'épiderme inférieur (figure 10) est moins épaisse (-20%).

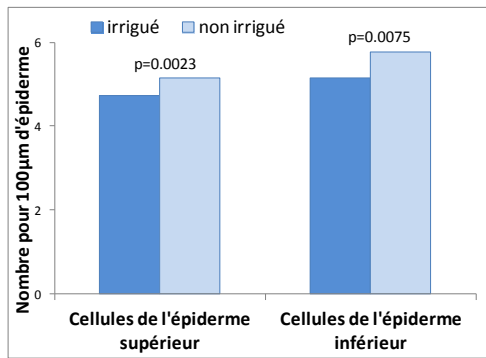


Figure 9: Influence du traitement hydrique sur le nombre de cellules des épidermes supérieur et inférieur

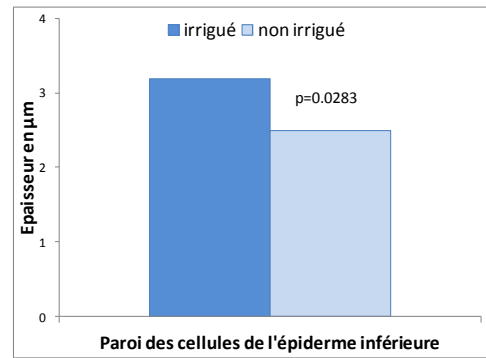


Figure 10: Influence du traitement hydrique sur l'épaisseur de la paroi des cellules de l'épiderme inférieure

La quantité d'amidon dans les cellules du mésophylle estimée par % de surface d'amidon par rapport à la surface du mésophylle (figure 11) ou en nombre de grains (figure 12) augmente fortement (respectivement de + 45% et +60%).

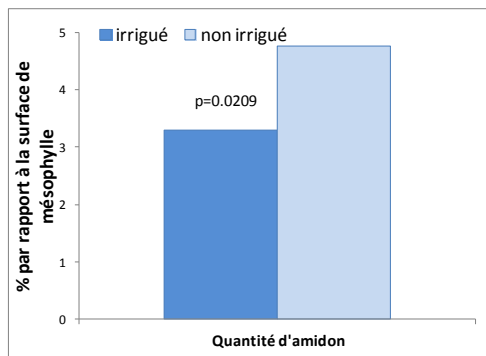


Figure 11: Influence du traitement hydrique sur la surface d'amidon

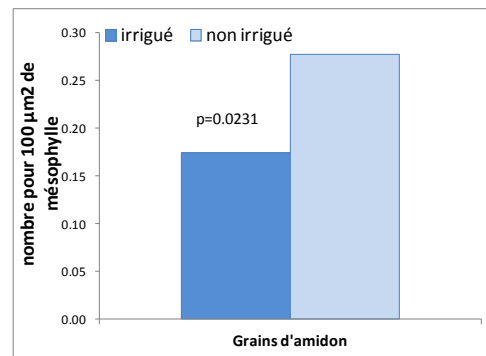


Figure 12: Influence du traitement hydrique sur le nombre de grains d'amidon

### **1.1.1. Influence de la date de prélèvement sur les caractères anatomiques foliaires**

Les dates de prélèvement correspondent à la fin de la saison sèche de la 1<sup>ère</sup> année et de la 2<sup>ème</sup> année de végétation. La date de prélèvement influe sur presque tous les caractères anatomiques, sans variation en fonction du génotype et du traitement hydrique (voir annexe 6b). Les valeurs des caractères liés à la structure, épaisseur des tissus ainsi que le nombre de cellules des épidermes, sont plus élevées à 20 mois (deuxième saison sèche) qu'à 8 mois (première saison sèche). A 20 mois, la quantité d'amidon est plus faible (-60%) de même que l'épaisseur du parenchyme palissadique (-11%), sans variation des espaces intercellulaires. De plus, l'épaisseur du parenchyme lacuneux augmente (+43%) tandis que les espaces intercellulaires lacuneux diminuent (-60%).

## **1.2. Analyse des polyphénols**

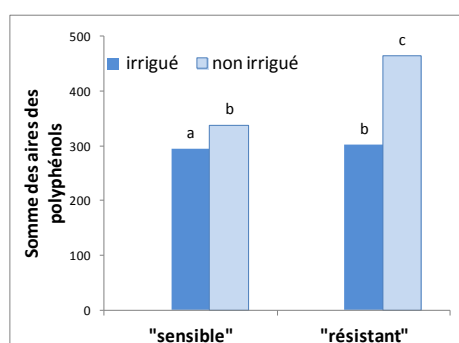
Dans les feuilles, 26 polyphénols ont été détectés et quantifiés par HPLC. L'analyse de variance et la comparaison des moyennes des quantités relatives (aire des pics des chromatogrammes) sont réalisées sur la quantité de polyphénols totaux (somme des aires de chaque polyphénol) et sur la teneur de chaque polyphénol. Les résultats sont détaillés en annexe 7a et 7b.

Les teneurs varient principalement en fonction du traitement hydrique et du génotype. Parmi ces 26 polyphénols, 20 ne sont présents que chez un seul génotype (9 chez le « résistant » et 11 chez le « sensible »). Les teneurs varient également en fonction de la date de prélèvement. Sur 25 polyphénols affectés par la date de prélèvement, 8 ne sont pas synthétisés à la fin de la 1<sup>ère</sup> saison sèche et 5 à la fin de la 2<sup>ème</sup> saison sèche. L'interaction date de prélèvement-génotype influe sur la teneur de 23 polyphénols dont 13 ne sont détectés que chez 1 génotype à 1 seule date de prélèvement.

Seule la teneur en polyphénols totaux et la teneur de 4 des 26 polyphénols détectés, varient en fonction de l'interaction génotype-traitement hydrique.

### **1.2.1. Influence de l'interaction génotype-traitement hydrique sur la variation de la teneur en polyphénols totaux**

Pour les 2 génotypes, la teneur en polyphénols totaux (figure 13) augmente significativement en condition non irriguée. Mais cette augmentation est plus importante chez le « résistant »



(+14% pour le sensible et +53% pour le « résistant »).

De plus, la date de prélèvement influe sur la teneur en polyphénols totaux, plus élevée à 8 mois qu'à 20 mois, mais la différence est peu significative ( $p \approx 0.05$ ) (voir annexe 7a).

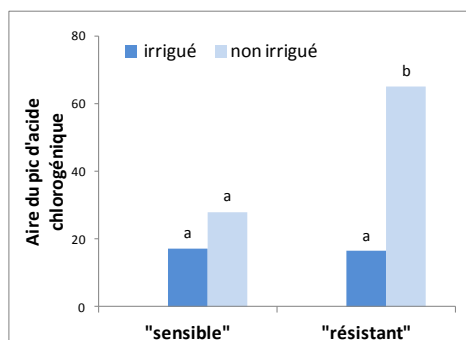
**Figure 13:** Influence de l'interaction génotype-traitement hydrique sur le teneur en polyphénols totaux

### **1.1.1. Influence de l'interaction génotype- traitement hydrique sur la variation de la teneur individuelle des polyphénols**

Seulement 5 polyphénols varient en fonction de l'interaction génotype x traitement et/ou date de prélèvement x génotype x traitement hydrique: 3 Acides Hydroxycinnamiques (Acide

Chlorogénique et 2 isomères d'Acides Coumaroyl Quinique) et 1 Flavonol (Quercétine Galloyl Hexoside).

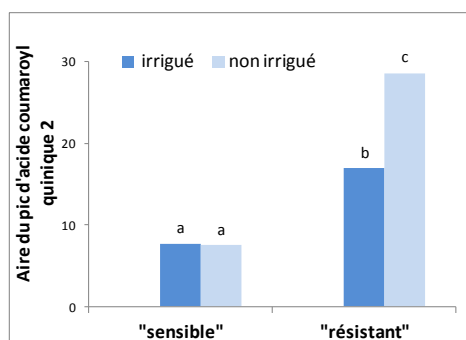
✓ L'Acide Chlorogénique (figure 14) augmente significativement chez le génotype « résistant » en traitement non irrigué (+293% par rapport au traitement irrigué).



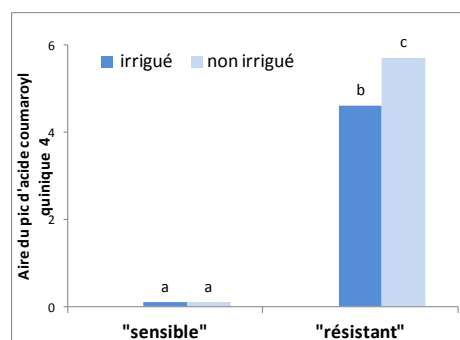
Pour les 2 génotypes, sa teneur est plus élevée à 8 mois qu'à 20 mois ( $p=0.015$ ), et elle est significativement plus élevée à 8 mois en condition non irriguée ( $p=0.0183$ ) (voir annexe 7a) qu'en condition irriguée.

**Figure 14:** Influence de l'interaction génotype-traitement hydrique sur la teneur en Acide Chlorogénique

✓ Les 2 isomères Acide Coumaroyl Quinique 2 (figure 15) et Acide Coumaroyl Quinique 4 (figure 16) augmentent significativement chez le génotype « résistant » non irrigué par rapport au traitement irrigué (isomère 2 = +69% ; isomère 4 = +24%). En revanche, chez le génotype « sensible », l'acide Coumaroyl Quinique 2 ne varie pas et l'Acide Coumaroyl Quinique 4 est inférieur au seuil de détection.



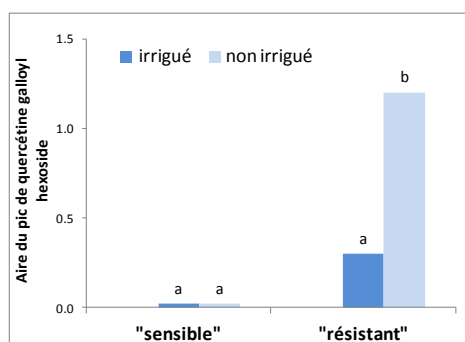
**Figure 15:** Influence de l'interaction génotype-traitement hydrique sur la teneur en Acide coumaroyl quinique 2



**Figure 16:** Influence de l'interaction génotype-traitement hydrique sur la teneur en Acide coumaroyl quinique 4

Chez les 2 génotypes, leur teneur est significativement plus élevée à 8 mois qu'à 20 mois (isomère 2:  $p<0.001$  ; isomère 4 :  $p= 0.0005$  indépendamment du traitement hydrique (voir annexe 7a).

Le Quercétine Galloyl Hexoside (figure 17) n'est présent que chez le génotype « résistant » et sa teneur augmente significativement en condition non irriguée (+300% par rapport à irrigué). Il n'est pas détecté à 8 mois (voir annexe 7b).



**Figure 17:** Influence de l'interaction génotype-environnement sur la teneur en Quercétine galloyl hexoside

## 1.2. Discussion

Les 2 géotypes (clones) d'Eucalyptus, utilisés dans cette étude, ont été nommés « sensible » et « résistant » en raison de leurs paramètres physiologiques et de croissance très contrastés dans des conditions environnementales peu favorables. Ils sont issus de deux générations successives du programme d'amélioration au Congo où, à l'origine, différentes espèces d'Eucalyptus provenant d'Indonésie ont été plantées. Le géotype « sensible » est un hybride naturel d'origine mal connue apparu au sein de ces plantations et sélectionné lors de la 1<sup>ère</sup> génération. Le géotype « résistant » est un hybride artificiel issu de la sélection de 2<sup>ème</sup> génération. Ce sont 2 clones commerciaux qui ont été sélectionnés au Congo selon des caractères de croissance dans des conditions écologiques peu favorables. Le climat au Congo est caractérisé par une longue saison sèche de 5 mois associée à un sol à faible capacité de rétention de l'eau, car composé de 85% de sable (Laclau et al., 2001). L'essai expérimental mis en place pour ce travail a en effet montré que pendant la saison sèche, il y a de fait une inhibition de la croissance des 2 géotypes. Toutefois, la croissance du « résistant » reste plus élevée que celle du « sensible ». En saison des pluies, la croissance accélère mais la différence entre les 2 géotypes est toujours en faveur du « résistant ».

Notre étude avait pour objectif d'estimer l'impact du stress hydrique sur ces 2 géotypes par l'analyse de l'anatomie et de la teneur en polyphénols des feuilles. Nous avons analysé ces caractères sur des feuilles prélevées en fin de 2 saisons sèches pendant lesquelles les géotypes ont été soumis à 2 traitements hydriques : non-irrigué (correspondant aux conditions naturelles, avec 5 mois de sécheresse), irrigué (levée de la contrainte hydrique par irrigation).

**Différences constitutives dans l'anatomie et la teneur en polyphénols foliaires de deux géotypes contrastés d'Eucalyptus, et leur impact potentiel sur la résistance à la saison sèche**

Des différences phénotypiques essentielles caractérisent chacun des deux génotypes indépendamment de nos conditions expérimentales (traitement, date de prélèvement) (figure 18). Ces différences peuvent être qualifiées de différences constitutives entre les deux génotypes. Elles pourraient conférer un avantage au génotype résistant ou à l'inverse représenter un inconvénient pour le génotype sensible lorsqu'ils sont soumis à une période de sécheresse. Il est intéressant de discuter quelle pourrait être l'influence de ces caractères constitutifs sur l'aptitude des deux génotypes à résister à la sécheresse.

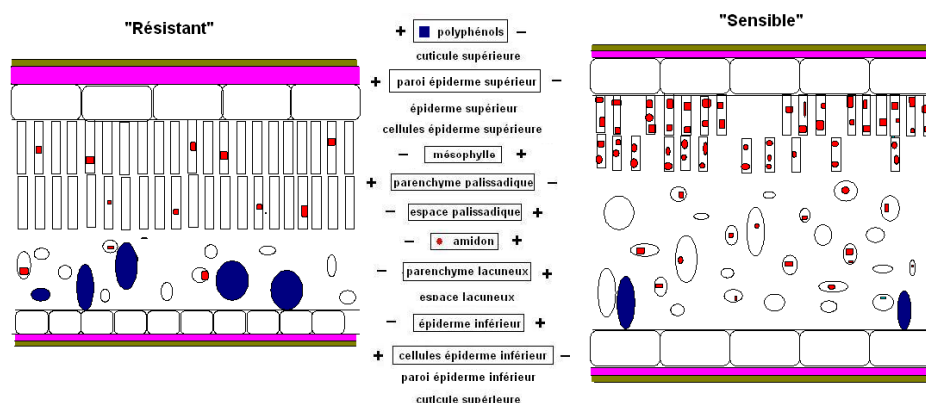


Figure 18: Anatomie comparative des feuilles des deux génotypes : schéma synthétique des différences constitutives entre le génotype résistant et le génotype sensible à la sécheresse.

Les deux génotypes diffèrent par les caractéristiques de leurs épidermes (tissu de revêtement) qui joue le rôle de barrière entre le milieu extérieur et le milieu interne de la feuille. Ils sont directement impliqués dans le contrôle de la perte d'eau et les échanges gazeux ((Bacelar et al., 2004)). Alors qu'aucune différence au niveau de l'épiderme supérieur n'est observée, l'épiderme inférieur du génotype « résistant » est moins épais que celui du génotype « sensible », et contient plus de cellules. Ces cellules sont donc de taille réduite, ce qui rendrait cet épiderme plus résistant à une diminution trop importante de la pression de turgescence et au collapse (déchirement de la membrane et rupture des parois) (Cutler et al., 1977). Le génotype « résistant » a la particularité de n'avoir des stomates que sur l'épiderme inférieur contrairement au génotype « sensible », dont les stomates se trouvent sur les 2 épidermes. Ceci est considéré comme un caractère associé à la résistance à la sécheresse car les stomates de la face inférieure sont protégés des radiations lumineuses et de la chaleur (Bacelar, 2002).

La paroi supérieure des cellules de l'épiderme, directement sous la cuticule, est plus épaisse chez le génotype « résistant » que chez le génotype « sensible », ce qui permettrait de limiter l'évaporation de l'eau.

Les deux génotypes diffèrent également par les tissus impliqués dans la photosynthèse (parenchyme palissadique et parenchyme lacuneux). Le mésophylle du génotype « résistant » est moins épais ce qui est en corrélation directe avec la taille et l'épaisseur réduite de ses feuilles par rapport au génotype « sensible » (Villar et al., 2011). La réduction de la surface et de l'épaisseur des feuilles pourrait être dû à la diminution de l'expansion cellulaire induite par le déficit hydrique (Hsiao, 2000). Des petites feuilles sont donc un caractère d'adaptation à la sécheresse.

Le génotype « résistant » a un parenchyme palissadique plus épais que le génotype « sensible » mais avec moins d'espace intercellulaire. Il contient donc plus de cellules palissadiques, et de chloroplastes. De plus, son mésophylle contient moins d'amidon. L'amidon permet à la plante de stocker les sucres produits par la photosynthèse. Le génotype « résistant » pourrait avoir une capacité photosynthétique plus importante que le génotype « sensible » et synthétiserait donc plus de sucres. De plus, il utiliserait ses sucres préférentiellement pour son métabolisme alors que le génotype « sensible » favoriserait le stockage sous forme d'amidon. Cette préférence pour le stockage pourrait être le résultat d'une capacité limitée dans le transport des sucres, indépendamment des besoins (Hunter, 1995), et expliquerait la croissance moindre du génotype « sensible ».

Le parenchyme lacuneux du génotype « résistant » est moins épais que le « sensible ». On peut supposer que la diminution de l'épaisseur de son parenchyme lacuneux, associée à la diminution de l'épaisseur de son mésophylle, permet de compenser l'augmentation de l'épaisseur de son parenchyme palissadique. Mais la surface des espaces intercellulaires du parenchyme lacuneux, est identique entre les 2 génotypes. Chez l'Olivier en déficit hydrique, l'épaisseur du parenchyme lacuneux est plus élevée, attribuée à une augmentation des espaces intercellulaires ce qui améliorerait la diffusion du CO<sub>2</sub> (Ennajeh et al., 2010).

Les deux génotypes se différencient également par leur contenu foliaire en polyphénols. Les feuilles du génotype « résistant » contiennent globalement plus de polyphénols que celles du « sensible ». Les polyphénols ont un rôle dans le maintien de la structure cellulaire et sa protection, en particulier comme capteurs de radicaux libres (Bidel et al., 2010). Le génotype « résistant » aurait donc une meilleure capacité de lutte contre les radicaux libres que le génotype « sensible ». Le type de polyphénols synthétisé est fortement lié à une espèce ou à un groupe d'espèces (Mazid et al., 2011). De fait nous avons trouvé 11 polyphénols présents uniquement chez le « résistant », et 9 chez le génotype « sensible ». Les polyphénols sont également des régulateurs de la machinerie cellulaire (protéines nucléaires, enzymes



cytosoliques ou membranaires...), et la plupart sont des inhibiteurs directs de l'expression des gènes et de la production du signal (Bidel et al., 2010). Leur rôle est spécifique des tissus dans lesquels ils sont synthétisés, et il est donc difficile d'estimer ce rôle sans avoir accès à cette information.

### **Quel est l'impact respectif du déficit hydrique sur la structure des feuilles des 2 géotypes et sur leur teneur en polyphénols?**

Pour les 2 géotypes étudiés, un faible nombre de caractères foliaires varie en fonction du traitement hydrique. Contrairement à ce qui est rapporté sur d'autres espèces, nous n'avons pas observé pour l'Eucalyptus d'effet du déficit hydrique saisonnier sur l'épaisseur de la cuticule. Celle-ci augmente généralement dans des conditions de déficit hydrique ce qui permet une limitation de l'évaporation de l'eau (Bosabalidis and Kofidis, 2002; Kosma et al., 2009). On pourrait supposer que son épaisseur est suffisante chez nos 2 géotypes, et qu'elle ne constitue pas un facteur limitant pour la résistance à la sécheresse.

En condition non irriguée, les épidermes supérieur et inférieur des 2 géotypes ont des cellules plus petites ce qui augmenterait la résistance au collapse (Cutler et al., 1977). De plus, l'épaisseur de la paroi des cellules de l'épiderme inférieur diminue. La variation de ce caractère ne conférerait aucun avantage, mais n'a pas d'impact négatif puisqu'il est présent chez les 2 géotypes.

Les feuilles contiennent plus d'amidon en condition non irriguée. Dans la littérature, il a été montré que la quantité d'amidon diminue dans les feuilles soumises à un stress hydrique. Chez le chêne l'amidon diminue en condition de déficit hydrique tandis qu'en fin de stress, les réserves d'amidon sont reconstituées (Epron and Dreyer, 1996). La diminution de la quantité d'amidon dans les feuilles a également été montrée chez l'Eucalyptus au champ soumis à un stress hydrique (Arndt et al., 2008; Quick et al., 1992). Dans ces conditions, la diminution de la photosynthèse induirait une dégradation de l'amidon, et transport des sucres vers les jeunes tissus (Chang, 1980). L'augmentation de l'amidon dans les feuilles, que nous avons observé en condition non irriguée, pourrait résulter d'un maintien de la photosynthèse en dépit de la diminution de la croissance, une stratégie de stockage du carbone dans les feuilles pourrait alors être mise en place.

Un effet de l'interaction géotype-traitement a été détecté pour la teneur en polyphénols totaux ainsi que pour celle de 4 polyphénols. Ces teneurs augmentent en traitement non irriguée chez le géotype « résistant », et 2 des ces 4 polyphénols (l'acide Coumaroyl Quinique

4 et la Quercétine galloyl hexoside ne sont pas détectés chez le génotype sensible. L'acide Chlorogénique, dérivé d'acide cinnamique, est connu pour son rôle d'antioxydant, de capteur de radicaux libres et d'inhibiteur de l'activité lipoxigénase dans les feuilles (Torel et al., 1986). Il inhiberait l'ouverture des stomates (Plumbe and Willmer, 1986). L'Acide Chlorogénique, ainsi que les acides Coumaroyl Quinique, sont surexprimés en réponse à un stress abiotique (Koskimäki et al., 2009) en réponse à un stress hydrique, aux nématodes et à la combinaison des 2 (Atkinson et al., 2011). Quant à la Quercétine Galloyl Hexoside, elle est connue pour avoir un rôle de capteurs de radicaux libres, et est synthétisée en réponse à des traitements UV-B (Harborne and Williams, 2000). Les polyphénols du génotype « résistant » constituent un caractère plastique puisqu'il peut être modulé en fonction de l'environnement hydrique de façon à permettre une meilleure résistance à la saison sèche.

### **Caractères constitutifs vs caractères plastiques dans l'adaptation des clones d'eucalyptus à la saison sèche**

Le génotype « résistant » possède des caractères foliaires constitutifs avantageux, auxquels s'ajoutent des modifications adaptatives observées en conditions de stress chez les 2 génotypes. Ces modifications confèrent une capacité de résistance à la saison sèche plus importante. Les modifications adaptatives, qui reflètent une certaine plasticité phénotypique, ne concernent que quelques caractères (nombre de cellules des épidermes, quantité d'amidon, teneurs en polyphénols). Elles se retrouvent chez les 2 génotypes (sans différence entre le « sensible » et le « résistant »), excepté pour la teneur en polyphénols qui augmente de façon plus importante pour le génotype « résistant » que pour le génotype « sensible ». Ainsi les polyphénols permettent de mettre en évidence une plasticité plus importante pour le génotype « résistant » que pour le génotype « sensible » lorsqu'ils sont soumis à la saison sèche.

Pour les caractères foliaires et les génotypes étudiés, nos résultats montrent que la résistance au stress hydrique chez l'eucalyptus pourrait être principalement constitutive, avec quelques effets adaptatifs au niveau de la synthèse des polyphénols. Ce résultat peut être expliqué par l'historique des 2 clones. Bien qu'ayant une origine différente, ils sont tous les 2 issus d'une hybridation naturelle ou artificielle et ont été sélectionnés dans la région où a été mise en place l'expérimentation. Les 2 génotypes sont donc au départ particulièrement bien adaptés aux conditions locales, et leur phénotype résulte de la sélection naturelle.

## Conclusion

Cette étude a été conduite grâce à une expérimentation mise en place en milieu naturel. Elle vise à étudier l'impact du stress hydrique sur 2 géotypes contrastés d'Eucalyptus. L'objectif sur le long terme est l'amélioration des plantations industrielles. Il était intéressant de travailler dans des conditions les plus proches des conditions réelles même si un dispositif au champ présente des variations non contrôlées par rapport aux expérimentations en serre. Notre dispositif a été pensé afin de limiter l'impact possible des variations environnementales non contrôlables et s'est accompagné de mesures (données météorologiques, humidité du sol) afin de les intégrer dans les analyses. De plus, notre étude qui porte sur les caractères anatomiques et les polyphénols foliaires, s'inscrit dans un projet pluridisciplinaire qui a permis de collecter des données architecturales, écophysiological et moléculaires (transcriptomique). La multitude des données générées est actuellement en cours d'analyse. La synthèse des différentes approches devraient permettre de mieux comprendre les bases de la résistance à la saison sèche chez l'Eucalyptus.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Plan d'expérimentation

Le plan d'expérimentation a été mis en place à Yanika, dans le département du Kouilou, au sud du Congo (voir annexe 8), dans le cadre d'une étude de la plasticité phénotypique et moléculaire de deux clones d'eucalyptus sous contrainte hydrique au champ (Villar et al., 2011). Pendant 18 mois, 2 géotypes d'Eucalyptus ont été soumis à 2 régimes hydriques, irrigué et non irrigué en saison sèche (figure 19) selon le protocole détaillé en annexe 9. Les échantillons analysés pour l'anatomie foliaire et la teneur en polyphénols, ont été prélevés à P2 (8 mois d'âge) et P5 (20 mois d'âge) soit à 1 an d'intervalle.

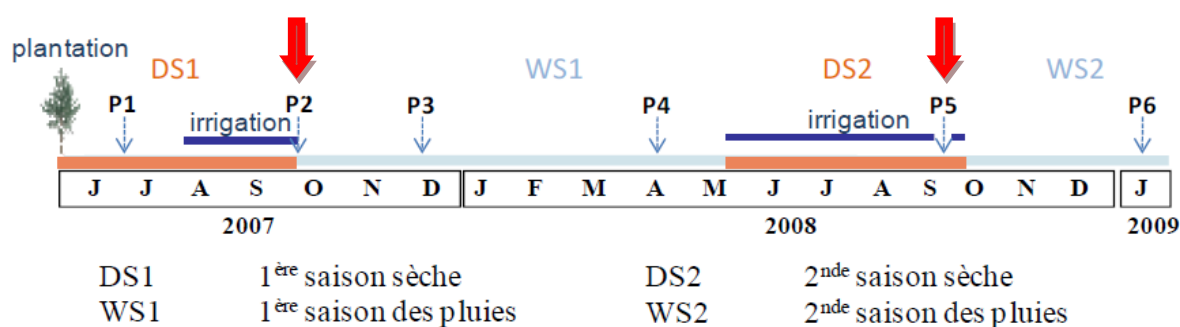


Figure 19: Déroulement de l'expérimentation

## **2.2. Matériel végétal**

Deux génotypes d'Eucalyptus ont été sélectionnés présentant des caractéristiques physiologiques et de croissance contrastées détaillées en annexe 5.

## **2.3. Analyses de l'anatomie foliaire**

Les feuilles prélevées ont conservées dans du fixateur jusqu'à la préparation des coupes. Puis différents caractères anatomiques ont été mesurés par analyse d'image (voir annexe 10).

## **2.4. Analyse de la teneur en polyphénols**

Dix feuilles par individus ont été congelés dans l'azote liquide jusqu'à analyse qualitative et quantitative des polyphénols par HPLC (voir annexe 11).

## **2.5. Analyse des données**

Les variations des caractères étudiés (anatomie des tissus foliaires, teneur en polyphénols) sont analysées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à 5% puis comparaison des moyennes par le test de Tukey à l'aide du logiciel SAS. Les pourcentages ont préalablement été transformés en racine arc-sinus.

### 3. Références bibliographiques

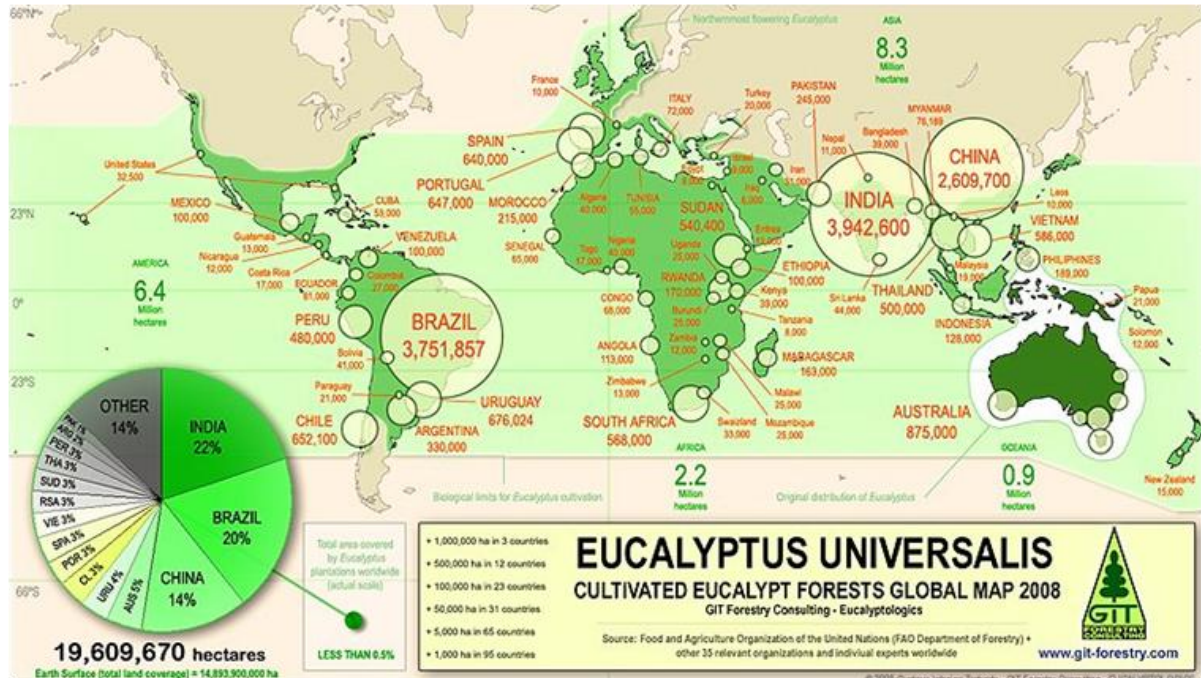
- Agarwal P., Jha B. (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum* 54:201-212.
- Allen C.D. (2009) Le dépérissement des forêts dû au climat: un phénomène planétaire croissant? *Revue internationale des forêts et des industries forestières* 60:43.
- Anjum S.A., Xie X.Y., Wang L.C., Saleem M.F., Man C., Lei W. (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6:2026-2032.
- Arndt S.K., Livesley S.J., Merchant A., Bleby T.M., Grierson P.F. (2008) Quercitol and osmotic adaptation of field-grown Eucalyptus under seasonal drought stress. *Plant Cell and Environment* 31:915-924.
- Atkinson N.J., Dew T.P., Orfila C., Urwin P.E. (2011) Influence of Combined Biotic and Abiotic Stress on Nutritional Quality Parameters in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:9673-9682.
- Bacelar E.A., Correia C.M., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves B.C., Lopes J.I., Torres-Pereira J.M.G. (2004) Sclerophylly and leaf anatomical traits of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree physiology* 24:233-239.
- Bacelar E.A., Santos D.L., Moutinho-Pereira J.M., Gonçalves B.C., Ferreira H.F., Correia C.M. (2006) Immediate responses and adaptative strategies of three olive cultivars under contrasting water availability regimes: Changes on structure and chemical composition of foliage and oxidative damage. *Plant Science* 170:596-605.
- Bidel L.P.R., Coumans M., Baissac Y., Doumas P., Jay-Allemand C. (2010) Biological Activity of Phenolics in Plant Cells, Recent Advances in Polyphenol Research, Wiley-Blackwell. pp. 163-205.
- Bosabalidis A.M., Kofidis G. (2002) Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science* 163:375-379.
- Bouillet J.P., Laclau J.P., Arnaud M., M'Bou A.T., Saint-Andre L., Jourdan C. (2002) Changes with age in the spatial distribution of roots of Eucalyptus clone in Congo - Impact on water and nutrient uptake. *Forest Ecology and Management* 171:43-57.
- Boyko A., Kovalchuk I. (2011) Genome instability and epigenetic modification - heritable responses to environmental stress? *Current Opinion in Plant Biology* 14:260-266.
- Buckley T.N. (2005) The control of stomata by water balance. *The New phytologist* 168:275-92.
- Bussotti F., Bottacci A., Bartolesi A., Grossoni P., Tani C. (1995) Morpho-anatomical alterations in leaves collected from beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in conditions of natural water stress. *Environmental and Experimental Botany* 35:201-213.
- Casper B.B., Forseth I.N., Kempenich H., Seltzer S., Xavier K. (2001) Drought prolongs leaf life span in the herbaceous desert perennial *Cryptantha flava*. *Functional Ecology* 15:740-747.
- Chang C.W. (1980) Starch Depletion and Sugars in Developing Cotton Leaves. *Plant Physiology* 65:844-847.
- Chartzoulakis K., Patakas A., Kofidis G., Bosabalidis A., Nastou A. (2002) Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. *Scientia Horticulturae* 95:39-50.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. (2003) Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239-264.
- Chevin L.M., Lande R., Mace G.M. (2010) Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *Plos Biology* 8.
- Cramer G.R., Urano K., Delrot S., Pezzotti M., Shinozaki K. (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *Bmc Plant Biology* 11.
- Cruz de Carvalho M.H. (2008) Drought stress and reactive oxygen species: Production, scavenging and signaling. *Plant Signal Behav* 3:156-65.

- Cutler J.M., Rains D.W., Loomis R.S. (1977) The Importance of Cell Size in the Water Relations of Plants. *Physiologia Plantarum* 40:255-260.
- Ennajeh M., Vadel A.M., Cochard H., Khemira H. (2010) Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 85:289-294.
- Epron D., Dreyer E. (1996) Starch and soluble carbohydrates in leaves of water-stressed oak saplings. *Annales Des Sciences Forestieres* 53:263-268.
- FAO. (2008) Global demand for wood products.
- Flexas J., Medrano H. (2002) Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann Bot* 89:183-9.
- Gaudillere J.P., Barcelo M.O. (1990) Effects of water and osmotic factors on the growth of wheat tillers. *Agronomie* 5:423-432.
- Hamanishi E.T., Raj S., Wilkins O., Thomas B.R., Mansfield S.D., Plant A.L., Campbell M.M. (2010) Intraspecific variation in the *Populus balsamifera* drought transcriptome. *Plant Cell and Environment* 33:1742-1755.
- Harborne J.B., Williams C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55:481-504.
- Hernandez I., Alegre L., Van Breusegem F., Munne-Bosch S. (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science* 14:125-132.
- Hsiao T.C. (2000) Leaf and root growth in relation to water status. *Hortscience* 35:1051-1058.
- IPCC. (2007) Changements climatiques 2007. Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Kim T.H., Bohmer M., Hu H., Nishimura N., Schroeder J.I. (2010) Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annual Review of Plant Biology* 61:561-91.
- Koskimäki J., Hokkanen J., Jaakola L., Suorsa M., Tolonen A., Mattila S., Pirttilä A., Hohtola A. (2009) Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (<i>Vaccinium myrtillus</i>) against biotic stress. *European Journal of Plant Pathology* 125:629-640.
- Kosma D.K., Bourdenx B., Bernard A., Parsons E.P., Lu S., Joubes J., Jenks M.A. (2009) The Impact of Water Deficiency on Leaf Cuticle Lipids of Arabidopsis. *Plant Physiology* 151:1918-1929.
- Laajimi N.O., Boussadia O., F.H. S., Teixeira Da silva J.A., S. R., Hellali R. (2011) Anatomical adaptations in vegetative structures of Apricot tree (*Prunus armenica* L.) cv. 'Amor El Euch' grown under water stress. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* 5 46-51.
- Labra M., Vannini C., Sala E., Bracale M. (2002) Methylation changes in specific sequences in response to water deficit. *Plant Biosystems* 136:269-275.
- Laclau J.P., Arnaud M., Bouillet J.P., Ranger J. (2001) Spatial distribution of Eucalyptus roots in a deep sandy soil in the Congo: relationships with the ability of the stand to take up water and nutrients. *Tree physiology* 21:129-136.
- Levitt J. (1972) Responses of plants to environmental stresses [by] J. Levitt Academic Press, New York.
- Li B.S., Qin Y.R., Duan H., Yin W.L., Xia X.L. (2011) Genome-wide characterization of new and drought stress responsive microRNAs in *Populus euphratica*. *Journal of Experimental Botany* 62:3765-3779.
- Lo Bianco R., Rieger M., Sung S.-J.S. (2000) Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum* 108:71-78.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139-158.
- Mazid M., Khan T.A., Mohammad F. (2011) Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine* 3:232-249.
- Merchant A., Callister A., Arndt S., Tausz M., Adams M. (2007) Contrasting physiological responses of six Eucalyptus species to water deficit. *Annals of Botany* 100:1507-1515.

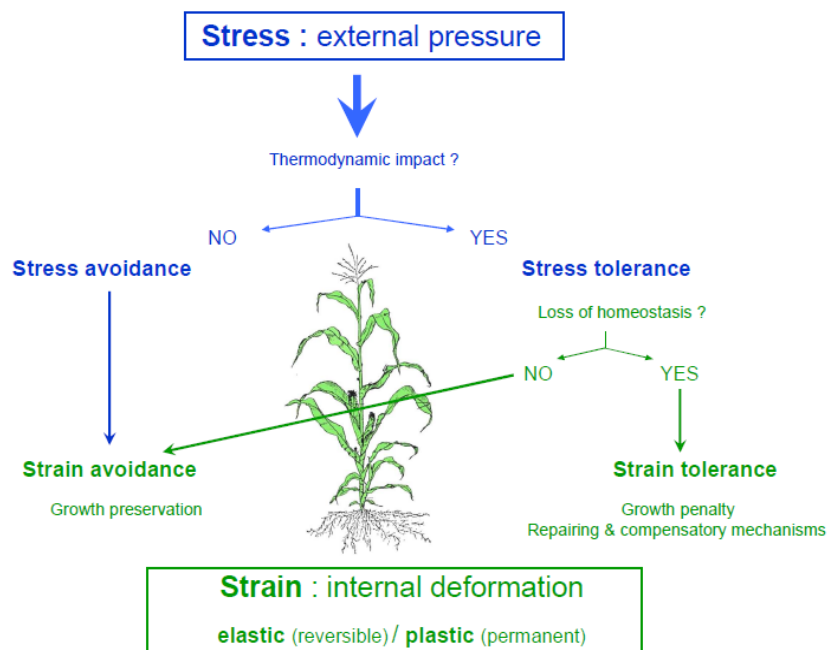
- Mertz C., Cheynier V., Gunata Z., Brat P. (2007) Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55:8616-8624.
- Mirouze M., Paszkowski J. (2011) Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 14:267-74.
- Molinier J., Ries G., Zipfel C., Hohn B. (2006) Transgeneration memory of stress in plants. *Nature* 442:1046-1049.
- Nanson A. (2004) Génétique et amélioration des arbres forestiers, in: L. p. a. d. Gembloux (Ed.).
- Neumann P.M. (2011) Recent Advances in Understanding the Regulation of Whole-Plant Growth Inhibition by Salinity, Drought and Colloid Stress. *Plant Responses to Drought and Salinity Stress: Developments in a Post-Genomic Era* 57:33-48.
- Osakabe Y., Kajita S., Osakabe K. (2011) Genetic engineering of woody plants: current and future targets in a stressful environment. *Physiologia Plantarum* 142:105-117.
- Plumbe A.M., Willmer C.M. (1986) PHYTOALEXINS, WATER-STRESS AND STOMATA. *New Phytologist* 103:17-22.
- Pospisilova J., Synkova H., Rulcova J. (2000) Cytokinins and water stress. *Biologia Plantarum* 43:321-328.
- Potters G., Pasternak T.P., Guisez Y., Jansen M.A.K. (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell and Environment* 32:158-169.
- Quick W.P., Chaves M.M., Wendler R., David M., Rodrigues M.L., Passaharinho J.A., Pereira J.S., Adcock M.D., Leegood R.C., Stitt M. (1992) The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell & Environment* 15:25-35.
- Quirino B.F., Noh Y.-S., Himelblau E., Amasino R.M. (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Science* 5:278-282.
- Ramachandra R.A., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161:1189-202.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58:221-227.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M. (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410-417.
- Shunder S.S. (1991) The ecological, economic and social effect of Eucalyptus. FAO.
- Skirycz A., Inze D. (2010) More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* 21:197-203.
- Torel J., Cillard J., Cillard P. (1986) Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25:383-385.
- Turner N.C., Otoole J.C., Cruz R.T., Namuco O.S., Ahmad S. (1986) Responses of 7 Diverse Rice Cultivars to Water Deficits .1. Stress Development, Canopy Temperature, Leaf Rolling and Growth. *Field Crops Research* 13:257-271.
- Verslues P.E., Sharma S. (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* 8:e0140.
- Villar E., Klopp C., Noirot C., Novaes E., Kirst M., Plomion C., Gion J.M. (2011) RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. *Bmc Genomics* 12:538.
- Winkel-Shirley B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:218-223.

#### 4. Annexes

**Annexe 1 :** Surface mondiale de plantations d'Eucalyptus en 2008 (Source : [www.git-forestry.com](http://www.git-forestry.com))

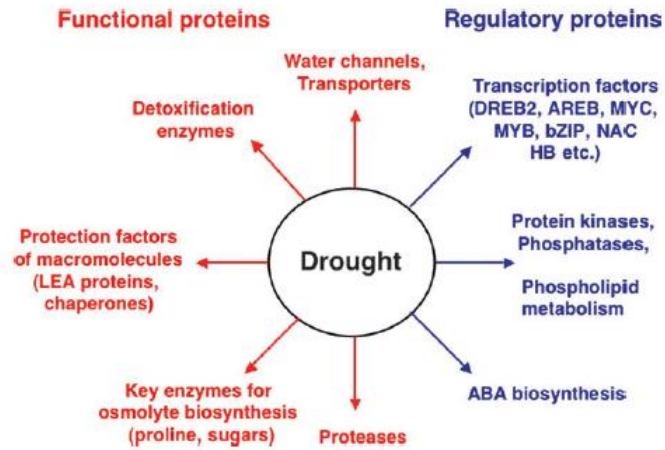


**Annexe 2 :** Stratégie général des mécanismes de résistance à la sécheresse (Levitt, 1972)

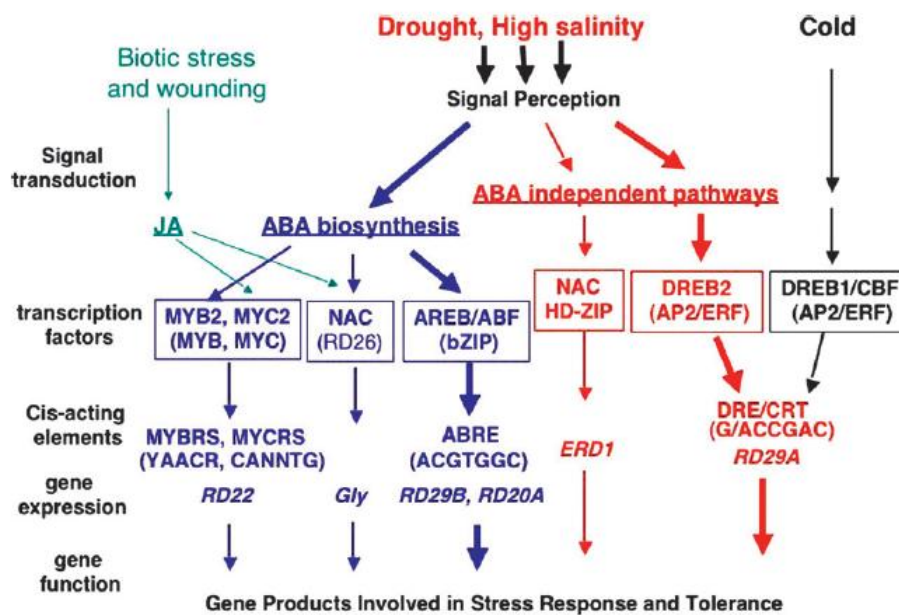




**Annexe 3 :** Principales fonctions des gènes impliqués dans la réponse et la tolérance au stress hydrique (Shinozaki, 2007)



**Annexe 4 :** Réseau de régulation transcriptionnelle des stress abiotiques et expression des gènes (Shinozaki, 2007)



**Annexe 5 :** Caractéristiques physiologique et croissance des géotypes utilisés pour l'expérimentation

- Génotype 1-41 ou « sensible »: C'est un hybride naturel apparu au sein des plantations issu d'une pollinisation non contrôlée entre un *E.alba* (arbre mère) avec un groupe de Eucalyptus hybrides mal identifiés (arbre père), comprenant *E.grandis*, *E.robusta*, *E.urophylla* et *E.botryoïdes*. Cet hybride est une référence pour l'amélioration et les essais de sylviculture, et il est le clone le plus planté à Pointe Noire (Congo).
- Génotype 18-50 ou « résistant » : C'est un hybride artificiel issu d'une pollinisation contrôlée entre *E.urophylla* et *E.grandis*. Ce génotype amélioré, remplaçant le clone 1-41 dans les plantations industrielles, est très performant avec une forte potentialité de croissance et une meilleure efficacité de l'eau (perte d'eau moindre par les stomates). Ce génotype possède des stomates seulement sur la face inférieure.

	<b>Génotype 1-41</b> "sensible"	<b>Génotype 18-50</b> "résistant"
Accroissement annuel (m3.ha-1.a-1)	25.1	28.5
Surface spécifique moyenne (m2.kg-1)	11.2	12.2
Surface foliaire moyenne (cm-2)	56.3	26.8
Disposition des stomates	amphistomatique	hypostomatique
Efficacité d'utilisation de l'eau (gC.kg-1.H2O)	2.2	4.3

Accroissement annuel : Safou-Matondo *et al.*, 2005

Surface spécifique moyenne : Villar et al, 2011

Surface foliaire moyenne, efficacité de l'utilisation de l'eau, position des stomates : Communication personnelle, Dr. Y. Nouvellon, UMR80, CIRAD, France

## Annexe 6a : Analyse de variance et comparaison des moyennes des caractères anatomiques foliaires

	Structure foliaire									
	Epaisseur Epiderme Supérieur	Nombre cellules Epiderme Supérieur	Epaisseur Epiderme Inférieur	Nombre cellules Epiderme Inférieur	Epaisseur Paroi Supérieure	Epaisseur Paroi Inférieure	Epaisseur Cuticule Supérieure	Epaisseur Cuticule Inférieure	Epaisseur Mésophylle	% surface Palissadique/ Lacuneux
<b>Génotype</b>										
"I-41"	15.43	4.86	12.8a	5.17a	2.47a	2.61	4.54	4.43	247.13a	34.52a
"I8-50"	14.14	5.00	11.06b	5.74b	3.05b	3.07	3.63	4.16	225.30b	46.69b
p-values	0.1000	0.2835	<b>0.0042</b>	<b>0.0134</b>	<b>0.0004</b>	0.1344	0.0850	0.6506	<b>0.0391</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Traitement</b>										
"IR"	15.22	4.73a	11.75	5.15a	3.20	3.19a	3.73	3.78	233.09	42.05
"NIR"	14.35	5.14b	12.11	5.77b	2.32	2.50b	4.44	4.81	239.34	39.16
p-values	0.2599	<b>0.0023</b>	0.5157	<b>0.0075</b>	0.0798	<b>0.0283</b>	0.1671	0.1058	0.5379	0.2735
<b>Prélèvement</b>										
"8 mois"	15.45	4.53a	11.43	5.20a	2.57a	2.32a	----	----	209.49a	49.26a
"20 mois"	14.12	5.34b	12.43	5.72b	2.96b	3.37b	----	----	262.94b	31.94b
p-values	0.0907	<b>&lt;0.0001</b>	0.0800	<b>0.0245</b>	<b>0.0112</b>	<b>0.0017</b>	----	----	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Génotype x Traitement hydrique</b>										
"I-41 x IR"	16.30	4.69	13.08	4.82	3.06	2.92	4.16	4.13	248.60	33.42
"I-41 x NIR"	14.57	5.04	12.53	5.52	3.34	3.46	4.93	4.73	245.67	35.61
"I8-50 x IR"	14.14	4.76	10.42	5.47	2.08	2.31	3.31	3.43	217.59	50.67
"I8-50 x NIR"	14.13	5.24	11.70	6.02	2.57	2.69	3.96	4.89	233.00	42.70
p-values	0.2646	0.6116	0.1091	0.7245	0.6117	0.7816	0.8991	0.4802	0.3675	0.0608
<b>Prélèvement x Traitement hydrique</b>										
"8 mois x IR"	16.49	4.26	11.65	4.86	2.42	2.25	----	----	209.33	50.67
"8 mois x NIR"	14.41	4.79	11.21	5.54	2.53	2.39	----	----	209.66	47.85
"20 mois x IR"	13.95	5.19	11.85	5.43	2.72	2.98	----	----	256.87	33.42
"20 mois x NIR"	14.29	5.50	13.02	6.00	3.39	3.76	----	----	269.01	30.46
p-values	0.1218	0.3638	0.1588	0.8125	0.1975	0.2845	----	----	0.5599	0.9785
<b>Prélèvement x Génotype</b>										
"8 mois x I-41 "	15.51	4.33a	12.38	4.76	2.68a	2.67	----	----	213.23	43.17
"8 mois x I8-50 "	15.39	4.72a	10.48	5.64	2.26a	1.97	----	----	205.75	55.36
"20 mois x I-41 "	15.35	5.40b	13.23	5.58	3.72b	3.71	----	----	281.04	25.87
"20 mois x I8-50"	12.89	5.28b	11.65	5.85	2.39a	3.03	----	----	244.84	38.02
p-values	0.1353	<b>0.0475</b>	0.7699	0.1670	<b>0.0422</b>	0.9557	----	----	0.1638	0.9951
<b>Prélèvement x Génotype x Traitement</b>										
"8 mois x I-41 x IR"	16.60	4.10	13.13	4.54	2.89	2.76	----	----	211.82	40.07
"8 mois x I-41 x NIR"	14.43	4.56	11.63	4.98	2.47	2.59	----	----	214.65	46.27
"8 mois x I8-50 x IR"	16.39	4.42	10.16	5.18	1.94	1.74	----	----	206.83	61.27
"8 mois x I8-50 x NIR"	14.39	5.01	10.79	6.10	2.58	2.19	----	----	204.67	49.44
"20 mois x I-41 x IR"	16.00	5.28	13.03	5.10	3.23	3.08	----	----	285.38	26.78
"20 mois x I-41 x NIR"	14.70	5.52	13.43	6.06	4.21	4.34	----	----	276.69	24.95
"20 mois x I8-50 x IR"	11.89	5.10	10.68	5.76	2.21	2.88	----	----	228.36	40.06
"20 mois x I8-50 x NIR"	13.88	5.46	12.61	5.94	2.57	3.18	----	----	261.34	35.97
p-values	0.3138	1.0000	0.7829	0.1562	0.0567	0.1954	----	----	0.2543	0.1392

## Annexe 6b : Analyse de variance et comparaison des moyennes des caractères anatomiques foliaires

	Photosynthèse et métabolisme carboné					Echanges gazeux	
	Epaisseur Parenchyme Palissadique	% Espace intercellulaire Palissadique	Surface moyenne des grains d'Amidon	% surface Amidon	Nombre grains d'Amidon	Epaisseur Parenchyme Lacuneux	% Espace intercellulaire Lacuneux
<b>Génotype</b>							
"1-41"	58.83a	4.58a	16.50	4.77a	0.17a	187.56a	25.57
"18-50"	69.34b	2.69b	17.69	3.30b	0.27b	155.19b	32.29
p-values	<b>0.0039</b>	<b>0.0226</b>	0.3016	<b>0.0115</b>	<b>0.0182</b>	<b>0.0015</b>	0.0595
<b>Traitement</b>							
"IR"	64.38	4.38	16.75	3.29a	0.17a	167.97	31.02
"NIR"	63.79	2.90	17.43	4.77b	0.28b	174.78	26.84
p-values	0.8597	0.1609	0.5535	<b>0.0344</b>	<b>0.0231</b>	0.4567	0.2592
<b>Prélèvement</b>							
"8 mois"	68.00a	4.61	20.02a	5.84a	0.30a	140.73a	41.46a
"20 mois"	60.17b	2.67	14.17b	2.23b	0.15b	202.01b	16.40b
p-values	<b>0.0252</b>	0.0629	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0011</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Génotype x Traitement hydrique</b>							
"1-41 x IR"	57.90	4.76	15.57	2.57	0.14	189.97	25.40
"1-41 x NIR"	59.76	4.40	17.43	4.01	0.20	185.15	25.75
"18-50 x IR"	70.86	3.99	17.94	4.00	0.21	145.98	36.65
"18-50 x NIR"	67.83	1.39	17.44	5.54	0.35	164.41	27.93
p-values	0.4632	0.2897	0.3076	0.8199	0.2899	0.2087	0.2552
<b>Prélèvement x Traitement hydrique</b>							
"8 mois x IR"	68.92	5.79	20.03	5.03	0.24	139.67	45.28
"8 mois x NIR"	67.08	3.42	20.00	6.66	0.37	141.80	37.65
"20 mois x IR"	59.83	2.96	13.48	1.55	0.11	196.27	16.77
"20 mois x NIR"	60.50	2.37	14.87	2.89	0.19	207.75	16.03
p-values	0.7047	0.5537	0.5335	0.9660	0.6531	0.6082	0.4444
<b>Prélèvement x Génotype</b>							
"8 mois x 1-41 "	63.56	4.69	19.84	5.43	0.27	148.94	37.48
"8 mois x 18-50 "	72.46	4.52	20.19	6.26	0.34	132.53	45.45
"20 mois x 1-41 "	54.10	4.47	13.16	1.17	0.08	226.17	13.67
"20 mois x 18-50"	66.23	0.87	15.19	3.29	0.22	177.86	19.13
p-values	0.6264	0.0927	0.4647	0.1662	0.4918	0.0894	0.9458
<b>Prélèvement x Génotype x Traitement</b>							
"8 mois x 1-41 x IR"	59.96	4.80	18.52	4.06	0.21	151.16	36.01
"8 mois x 1-41 x NIR"	67.15	4.59	21.17	6.78	0.32	146.72	38.95
"8 mois x 18-50 x IR"	77.89	6.79	21.56	5.99	0.28	128.17	54.55
"8 mois x 18-50 x NIR"	67.00	2.25	18.84	6.53	0.41	136.87	36.35
"20 mois x 1-41 x IR"	55.84	4.73	12.63	1.08	0.08	228.78	14.79
"20 mois x 1-41 x NIR"	52.36	4.21	13.69	1.25	0.08	223.56	12.55
"20 mois x 18-50 x IR"	63.82	1.19	14.32	2.02	0.13	163.77	18.76
"20 mois x 18-50 x NIR"	68.64	0.54	16.05	4.55	0.30	191.95	19.51
p-values	0.0558	0.5433	0.1937	0.0698	0.3900	0.5788	0.1316

## Annexe 7a : Analyse de variance et comparaison des moyennes des teneurs en polyphénols

	Polyphénols totaux	Acide Hydroxycinnamique					Acide Hydroxy benzoïque	Flavones	
		acide coumaroyl quinique 1	acide chlorogénique	acide coumaroyl quinique 2	acide coumaroyl quinique 3	acide coumaroyl quinique 4	acide ellagique	apigénine C-hexoside 1	apigénine C-hexoside 2
<b>Génotype</b>									
"1-41"	317.0	19.6	20.5	7.6	0.0	0.0	0.0	7.7	19.9
"18-50"	383.6	0.0	40.7	22.7	1.6	5.2	0.5	0.0	0.0
p-values	0.0061	<0.0001	0.0093	<0.0001	0.001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Traitement</b>									
"IR"	299.3	8.9	14.8	12.3	0.7	2.3	0.2	4.0	9.8
"NIR"	401.3	10.7	46.4	18.0	0.9	2.8	0.2	3.8	10.0
p-values	0.0001	0.0708	0.0002	0.0002	0.6981	0.0193	0.5652	0.7714	0.848
<b>Prélèvement</b>									
"8 mois"	373.4	11.7	39.9	19.0	0.0	3.0	0.5	7.7	16.4
"20 mois"	327.3	7.9	21.3	11.3	1.6	2.2	0.0	0.0	3.5
p-values	0.0464	0.0008	0.015	<0.0001	0.001	0.0005	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Génotype x Traitement hydrique</b>									
"1-41 x IR"	295.6a	17.8	17.1a	7.7a	0.0	0.0a	0.0	7.9	19.7
"1-41 x NIR"	338.1b	21.5	28.0a	7.5a	0.0	0.0a	0.0	7.6	20.1
"18-50 x IR"	302.7b	0.0	16.5a	16.9b	1.4	4.6b	0.4	0.0	0.0
"18-50 x NIR"	464.6c	0.0	64.9b	28.6c	1.7	5.7c	0.5	0.0	0.0
p-values	0.0121	0.0708	0.0267	0.0002	0.6981	0.0193	0.5652	0.7714	0.848
<b>Prélèvement x Traitement hydrique</b>									
"8 mois x IR"	303.6	9.8	15.1a	15.8	0.0	2.8	0.4	7.9	16.3
"8 mois x NIR"	443.2	13.7	64.7b	22.2	0.0	3.2	0.5	7.6	16.5
"20 mois x IR"	295.1	8.0	14.5a	8.8	1.4	1.8	0.0	0.0	3.4
"20 mois x NIR"	359.5	7.8	28.1a	13.9	1.7	2.5	0.0	0.0	3.6
p-values	0.0986	0.0547	0.0183	0.635	0.6981	0.5093	0.5652	0.7714	0.9541
<b>Prélèvement x Génotype</b>									
"8 mois x 1-41"	354.3	23.5a	31.2	11.5	0.0a	0.0a	0.0a	15.5a	32.8a
"8 mois x 18-50"	392.4	0.0b	48.6	26.5	0.0a	6.0b	0.9b	0.0a	0.0b
"20 mois x 1-41"	279.7	15.8c	9.8	3.7	0.0a	0.0a	0.0a	0.0a	7.0c
"20 mois x 18-50"	374.8	0.0b	32.7	19.0	3.1b	4.3c	0.0a	0.0a	0.0b
p-values	0.2037	0.0008	0.6987	0.8857	0.001	0.0005	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Prélèvement x Génotype x Traitement</b>									
"8 mois x 1-41 x IR"	327	19.6	18.2	12.0	0.0	0.0	0.0	15.8	32.6
"8 mois x 1-41 x NIR"	381.7	27.3	44.2	11.1	0.0	0.0	0.0	15.1	32.9
"8 mois x 18-50 x IR"	280.1	0.0	12.0	19.7	0.0	5.6	0.9	0.0	0.0
"8 mois x 18-50 x NIR"	504.7	0.0	85.2	33.3	0.0	6.4	1.0	0.0	0.0
"20 mois x 1-41 x IR"	264.9	15.9	8.0	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7
"20 mois x 1-41 x NIR"	294.5	15.7	11.7	3.9	0.0	0.0	0.0	0.0	7.3
"20 mois x 18-50 x IR"	325.3	0.0	20.9	14.2	2.8	3.7	0.0	0.0	0.0
"20 mois x 18-50 x NIR"	424.4	0.0	44.5	23.9	3.5	5.0	0.0	0.0	0.0
p-values	0.2615	0.0547	0.3438	0.3218	0.6981	0.5093	0.5652	0.7714	0.9541

## Annexe 7b : Analyse de variance et comparaison des moyennes des teneurs en polyphénols

		Flavonoïdes																	
		Intécoline C- hexoside	Intécoline C- hexoside	quercétine galloïl hexoside	rutine	quercétine hexoside	quercétine glucuronide	quercétine hexoside	kampférol glucuronide	quercétine pentoside	quercétine rhamnoside / isorhamnetine pentoside	kampférol hexoside / glucuronide	isorhamnetine hexoside	isorhamnetine glucuronide	quercétine - galloïl pentoside	kampférol rutinoside	kampférol glucuronide	quercétine hexoside	kampférol pentoside
Génotype		1	2																
"1-41"	"1-41"	8.5	5.1	0.0	8.3	0.0	24.2	13.4	9.1	19.5	9.1	0.0	3.0	0.9	0.0	47.4	0.0	3.2	0.0
	"18-50"	0.0	0.0	0.7	0.0	5.7	19.4	1.9	2.8	19.5	0.0	7.6	0.0	0.0	2.7	0.0	68.4	0.0	8.1
	p-values	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0007	<0.0001	<0.0001	0.9850	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Traitement																			
"1R"	"1R"	4.4	2.4	0.1	3.7	3.1	21.6	7.5	6.3	18.7	4.7	3.5	1.5	0.4	1.4	28.0	30.7	1.6	4.2
	"NIR"	4.1	2.8	0.6	4.6	2.6	21.9	7.8	5.7	20.3	4.4	4.1	1.5	0.4	1.3	19.4	37.8	1.5	3.9
	p-values	0.2723	0.1042	0.0067	0.1751	0.3481	0.8468	0.6992	0.1781	0.5827	0.7343	0.4888	0.8498	0.7981	0.7396	0.0532	0.578	0.6590	0.6358
Prélèvement																			
"8 mois"	"8 mois"	3.2	2.5	0.7	2.6	1.4	15.7	6.6	7.8	30.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	47.4	68.4	0.0	0.0
	"20 mois"	5.4	2.7	0.0	5.7	4.6	27.8	8.7	4.1	8.7	9.1	7.6	3.0	0.9	2.7	0.0	0.0	3.2	8.1
	p-values	<0.0001	0.4147	0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0059	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Génotype x Traitement hydrique																			
"1-41 x 1R"	"1-41 x 1R"	8.9	4.7	0.0a	7.4	0.0	24.9	13.1	9.9	19.2	9.4	0.0	3.0	0.8	0.0	56.0	0.0	3.3	0.0
	"1-41 x NIR"	8.2	5.5	0.0a	9.2	0.0	23.4	13.8	8.3	19.7	8.8	0.0	3.0	0.9	0.0	38.9	0.0	3.1	0.0
	"18-50 x 1R"	0.0	0.0	0.3a	0.0	6.2	18.4	1.9	2.7	18.2	0.0	6.9	0.0	0.0	2.8	0.0	61.3	0.0	8.3
"18-50 x NIR"	"18-50 x 1R"	0.0	0.0	1.2b	0.0	5.3	20.4	1.8	3.0	20.8	0.0	8.2	0.0	0.0	2.6	0.0	75.5	0.0	7.9
	"18-50 x NIR"	0.2723	0.1042	0.0067	0.1751	0.3481	0.1596	0.5387	0.0609	0.6989	0.7343	0.4888	0.8498	0.7981	0.7396	0.0532	0.578	0.659	0.6358
	p-values																		
Prélèvement x Traitement hydrique																			
"8 mois x 1R"	"8 mois x 1R"	3.1	1.9a	0.3a	2.0	1.0	14.1a	5.5a	8.3	28.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	56.0	61.3	0.0	0.0
	"8 mois x NIR"	3.2	1.7.3a	1.2b	3.2	1.3	17.3a	7.6ab	7.4	31.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38.9	75.5	0.0	0.0
	"20 mois x 1R"	5.8	2.8bc	0.0a	5.5	5.2	29.2b	9.5b	4.4	8.8	9.4	6.9	3.0	0.8	2.8	0.0	0.0	3.3	8.3
"20 mois x NIR"	"20 mois x 1R"	5.0	2.5abc	0.0a	6.0	4.0	29.5b	7.9ab	3.9	8.6	8.8	8.2	3.0	0.9	2.6	0.0	0.0	3.1	7.9
	"20 mois x NIR"	0.1116	0.0041	0.0067	0.5667	0.1535	0.024	0.015	0.7057	0.5319	0.7343	0.4888	0.8498	0.7981	0.7396	0.0532	0.578	0.659	0.6358
	p-values																		
Prélèvement x Génotype																			
"8 mois x 1-41"	"8 mois x 1-41"	6.3a	4.9	0.0a	5.1a	0.0	15.5a	10.5a	10.0	38.9a	0.0a	0.0a	0.0a	0.0	0.0a	94.8a	0.0a	0.0a	0.0a
	"8 mois x 18-50"	0.0b	0.0	1.5b	0.0b	2.3	15.9a	2.6b	5.6	21.6b	0.0a	0.0a	0.0a	1.7	0.0a	0.0b	156.8b	0.0a	0.0a
	"20 mois x 1-41"	10.8c	5.3	0.0a	11.5c	0.0	32.8b	16.4c	8.2	0.0c	18.1b	0.0a	6.0b	0.0	0.0a	0.0b	0.0a	6.4b	0.0a
"20 mois x 18-50"	"20 mois x 1-41"	0.0b	0.0	0.0a	0.0b	9.2	22.9c	1.1b	0.0	17.4b	0.0a	15.1b	0.0a	0.0	5.4b	0.0b	0.0a	0.0a	16.2b
	"20 mois x 18-50"	<0.0001	0.4147	0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0004	<0.0001	0.0006	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	p-values																		
Prélèvement x Génotype x Traitement																			
"8 mois x 1-41 x 1R"	"8 mois x 1-41 x 1R"	6.2	3.8a	0.0a	3.9	0.0	15.1	8.7	11.2	38.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	111.9	0.0	0.0	0.0
	"8 mois x 1-41 x NIR"	6.5	6.1b	0.0a	6.4	0.0	15.9	12.3	8.9	39.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	77.7	0.0	0.0	0.0
	"8 mois x 18-50 x 1R"	0.0	0.0	0.5a	0.0	2.0	13.1	2.3	5.4	18.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	122.7	0.0	0.0
"8 mois x 18-50 x NIR"	"8 mois x 18-50 x 1R"	0.0	0.0c	2.4b	0.0	2.5	18.6	3.0	5.9	24.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	151.0	0.0	0.0
	"20 mois x 1-41 x 1R"	11.6	5.7b	0.0a	11.0	0.0	34.7	17.4	8.7	0.0	18.7	0.0	5.9	1.7	0.0	0.0	0.0	6.6	0.0
	"20 mois x 1-41 x NIR"	10.0	5.0ab	0.0a	12.0	0.0	30.9	15.3	7.8	0.0	17.5	0.0	6.0	1.8	0.0	0.0	0.0	6.2	0.0
"20 mois x 18-50 x 1R"	"20 mois x 18-50 x 1R"	0.0	0.0c	0.0a	0.0	10.3	23.7	1.6	0.0	17.6	0.0	13.9	0.0	0.0	5.6	0.0	0.0	0.0	16.7
	"20 mois x 18-50 x NIR"	0.0	0.0c	0.0a	0.0	8.0	22.1	0.6	0.0	17.2	0.0	16.4	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0	0.0	15.7
	p-values	0.1116	0.0041	0.0067	0.5667	0.1535	0.6131	0.1740	0.3421	0.6434	0.7343	0.4888	0.8498	0.7981	0.7396	0.0532	0.578	0.659	0.6358

## Annexe 8 : Localisation du plan d'expérimentation : région du Kouilou

(source [www.ird.congo.fr](http://www.ird.congo.fr))



## **Annexe 9 : Mise en place de l'expérimentation**

Les Eucalyptus ont été propagées de façon végétative par des boutures racinées, puis après 3 mois en pépinière, ont été plantés au stade juvénile au champ au début de la saison sèche. A ce stade, ils mesuraient entre 10 et 15 cm. Le champ a été divisé en 6 parcelles. Chaque parcelle est constituée de 4 blocs de 24 arbres correspondant aux 2 géotypes soumis aux 2 traitements d'irrigation (voir annexe x).

Avant plantation, un traitement herbicide (Glyphosate, Round-up, Monsanto, USA) a été appliqué, et après plantations, les mauvaises herbes ont été éliminées manuellement. Durant les 2 premières semaines avant plantations, les parcelles ont été irriguées (1L.day-1/plant). Un fertilisant a été appliqué après 2 semaines (200g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ /plant) ainsi qu'un insecticide (pyrethroid).

Les arbres ont été soumis à 2 régimes hydriques : irrigation vs non irrigation pendant la saison sèche. L'irrigation a été réalisée par aspersion dans l'objectif de maintenir l'évapotranspiration potentielle estimée à 3 mm par jour (Bouillet et al., 2002). Pendant l'expérimentation, l'irrigation a été réalisée pendant les 2 saisons sèches (DS1 et DS2) pendant lesquelles il y a une diminution de la pluviométrie. L'irrigation a également été appliquée pendant les saisons humides, quant les pluies sont plus faibles.



## **Annexe 10: Protocole de préparation des coupes de feuilles**

### **1-Fixation des tissus**

- Préparer le fixateur : 50 ml tampon Phosphate de Sodium 0,2M pH 7  
20 ml paraformaldéhyde à 10%  
2 ml glutaraldéhyde à 50%  
28 ml eau distillée  
1 g caféine
- Placer les échantillons dans le fixateur
- Mettre une goutte de tween 80
- Faire le vide pendant 30 min (Une série de plusieurs dégazages des échantillons favorise la pénétration du fixateur au sein des tissus aérénchymes.)
- Placer à 4°C pendant 48h
- Mettre dans l'éthanol 50/50 pendant 1h
- Mettre dans éthanol 70% et conserver à 4°C pendant une nuit

NB : Les échantillons peuvent être stockés dans l'éthanol 70% jusqu'à plusieurs mois.

### **2- Déshydratation**

- Trempage des échantillons dans l'éthanol 70% pendant 45mn
- Trempage des échantillons dans l'éthanol 90% pendant 1h
- Trempage des échantillons dans l'éthanol 95% pendant 1h
- Trempage des échantillons dans l'éthanol 100% pendant 1h
- Trempage des échantillons dans l'éthanol – butanol 50/50 pendant 24h à 4°C
- Placement des échantillons dans une solution butanol 100%.
- Faire le vide 30mn puis laisser 5 jours minimum dans cette solution au froid à 4°C en agitation. (L'agitation permet une meilleure pénétration de la solution dans les tissus)

### **3- Imprégnation**

- Préparer la résine « tissus durs » : 500 ml Kit Résine Technovit 7100  
5 g Initiateur (poudre)  
5 ml Méthyle méthacrylate  
2 ml Ethylène glycol diméthacrylate
- Mettre sous agitation jusqu'à dissolution complète de l'initiateur
- Garder en chambre froide
- Placer les échantillons dans une solution butanol 100% / résine tissus durs (50/50)
- Dégazer 30 min sous vide
- Placer 2 jours minimum à 4°C
- Placer les échantillons dans de la résine tissus durs 100 %,
- Faire le vide 30 minutes et placer à 4°C pendant au minimum 10 jours

### **4- Inclusion en résine**

- Préparation du milieu d'inclusion « tissus durs »: 15 ml résine « tissu dur » (protocole précédent) + accélérateur durcisseur 1ml

- Agiter pendant 1 min sans faire de bulles (le milieu est visqueux au bout de 15 à 30 min et polymérise à partir de 5 min (suivant la température ambiante).
- Verser le milieu d'inclusion de façon à ce que le niveau se situe un peu au-dessus de la dépression inférieure du moule.
- Eponger légèrement l'explant sur du papier au sortir du milieu d'imprégnation, l'immerger et l'orienter dans le moule tant que le milieu est liquide. Il est conseillé de surveiller sous loupe binoculaire la bonne orientation de l'objet. La réaction étant exothermique, il y a existence de mouvements de convection et possibilité de déplacement de l'explant au cours du durcissement.
- Laisser à température ambiante jusqu'à ce que la résine prenne autour puis placer les inclusions à 37° C 1 nuit jusqu'à ce que la résine ait complètement durcie

## **5- Coupe des échantillons**

Les échantillons inclus dans la résine sont collés sur un plot en plastique

Le plot est fixé sur le microtome équipé de lame jetable en acier (RM2255 Leica ).

Une approche manuelle est effectuée afin « d'entrer » dans l'échantillon. Puis les coupes d'une épaisseur de 3.5  $\mu\text{m}$  sont récupérées à l'aide d'une pince, déposées dans un bac rempli d'eau ultra- pure puis étalées sur des lames de verres et séchées sur une platine chauffante

## **6- Coloration sur lame et montage**

- Hydrolyse de 5 min à l'acide périodique (1% dans de l'eau distillée).
- Lavage à l'eau courante puis à l'eau distillée.
- Coloration avec le réactif de Schiff 10 min à l'obscurité.
- Lavage 4 à 5 min dans un bain d'eau sulfureuse (métabisulfite de sodium à 5% 5 ml, acide chlorhydrique N 5 ml, eau distillée 90 ml).
- Lavage à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau soit incolore puis à l'eau distillée (Il est important de changer rapidement les bains).
- Coloration 5 min dans le Naphtol bleu black (naphthol blue black 1 g, acide acétique 7 ml, eau distillée qsp 100 ml) préalablement chauffé à 50°C.
- Lavage rapide à l'eau courante.
- Régression par l'acide acétique à 7% dans l'eau distillée sous contrôle microscopique (Les parois doivent reprendre leur coloration rouge due au Schiff).
- Séchage et montage entrelame et lamelle avec le milieu de montage « Isomount »

## **7- Observation des coupes, prise d'image et analyse des photos**

L'observation des coupes est faite à l'aide d'un microscope optique (DM4500B, Leica) muni d'une caméra (Retiga 2000 R) relié à un ordinateur. Les photos sont visualisées et enregistrées à l'aide du logiciel Volocity (voir figure x), servant d'interface de contrôle du dispositif.

Les photos sont analysées avec le logiciel d'analyse d'image « Image-J » composé d'un module analysant les épaisseurs sur toute la longueur de la coupe. Les caractères ci-dessous sont mesurés en pixels puis transformés en  $\mu\text{m}$ .

---

**Caractères anatomiques foliaires**

---

Epaisseur du cuticule supérieur en  $\mu\text{m}$   
Epaisseur du cuticule inférieur en  $\mu\text{m}$   
Epaisseur de la paroi de l'épiderme supérieur  
Epaisseur de la paroi de l'épiderme inférieur  
Epaisseur de l'épiderme inférieur en  $\mu\text{m}$   
Epaisseur de l'épiderme supérieur en  $\mu\text{m}$   
Nombre de cellules de l'épiderme supérieur pour 100  $\mu\text{m}$  d'épiderme  
Nombre de cellules de l'épiderme inférieur pour 100  $\mu\text{m}$  d'épiderme  
Epaisseur du mésophylle en  $\mu\text{m}$   
Epaisseur du parenchyme palissadique en  $\mu\text{m}$   
Epaisseur du parenchyme lacuneux en  $\mu\text{m}$   
Ratio surface palissadique/lacuneux  
% espace intracellulaire du parenchyme palissadique  
% espace intracellulaire du parenchyme lacuneux  
% de surface totale des grains d'amidon par surface de mésophylle  
Surface moyenne des grains d'amidon  
Nombre de grains d'amidon pour 100  $\mu\text{m}^2$  de mésophylle

---

**Annexe 11 :** Caractérisation et quantification des polyphénols foliaires (L'extraction de polyphénols foliaires et leur mesure par HPLC ont été réalisées au sein de l'UMR Qualisud de Montpellier, et supervisées par Christian Mertz).

200 mg issus du broyage des feuilles ont été incubés 2 fois 10 min dans 10 ml d'Acétone 70% contenant 2% d'acide formique .

Les extraits ont été combinés, filtrés, concentrés sous vide, puis dissous dans 5 ml de mélange éthanol/eau (50/50: v/v).

Avant analyse par HPLC, ils ont de nouveau été filtrés avec un filtre Millipore de 0.45 µm. La séparation a été réalisée en phase réverse, à 30°C, avec une colonne ACE C-18 (250 mm × 4.6 mm ; taille des particules de 5 µm ) (AIT, Houilles, France). La quantification par HPLC a été réalisée sur un HPLC Dionex ( model P680 pumps, ASI 100 autosampler, UVD 340U diode array detector) couplé à une HP ChemStation (Dionex, France). L' identification a été réalisée sur un HPLC/MS (SURVEYOR HPLC, UV6000LP DAD, model P4000 pumps, AS3000 autosampler) couplé à un spectromètre de masse LCQ ion trap associé à une interface electrospray (Thermo Electron, San Jose, CA, USA).

Les paramètres LC/MS utilisés sont décrits dans (Mertz et al., 2007). Les solvants sont composés de 0.1% d'acide formique aqueux (solvant A) et d'un élange acétonitrile/eau/acide formique (80:19.9:0.1, v/v/v; solvant B). Les conditions du gradient sont : de 5 to 35% B pendant 50 min, de 35 to 50% B pendant 5 min, et de 50 to 80% B pendant 5 min. Puis la colonne est lave et équilibrée pendant 15 min. Le volume d'injection est de 10 µl et le débit de 0.7 ml.min<sup>-1</sup>. La détection est réalisée à 280, 330 et 360 nm.

Les composés ont été quantifiés par mesure de l'aire des pics et les résultats sont exprimés en mAu.min<sup>-1</sup>.